

THÈSE

présentée à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Mohamed BESRI

Ingénieur agronome

SUJET :

**Recherches concernant l'écologie, la morphologie
et la physiologie de l'agent du "Corky Root"**

Soutenue le 23 Novembre 1970, devant la Commission d'examen

Membres du Jury :

Président : M. F. MANGENOT

Examineurs : MM. J. GARNIER

G. VIENNOT-BOURGIN,

Membre de l'Académie d'Agriculture
Professeur à l'I.N.A.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551920_0007

THÈSE

présentée à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES

par

ROBERT BÉGIN

Ingénieur Agronome

Présentée et soutenue

le 10/11/71

Recherches concernant l'écologie, la morphologie
et la physiologie de l'agent de "Corky Root"

Soutenu le 23 Novembre 1970, devant la Commission d'examen

Membres du Jury

Président : M. J. HANUCCI

Membres : M. J. GARNIER

M. J. VERMOREL

Secrétaire : M. J. GARNIER

UDART & CLÉMENT

RELIEURS

11, Rue Sainte-Anne, 11

Tél. 52.80.09 - NANCY

THÈSE

présentée à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Mohamed BESRI

Ingénieur agronome

SUJET :

**Recherches concernant l'écologie, la morphologie
et la physiologie de l'agent du "Corky Root"**

Soutenue le 23 Novembre 1970, devant la Commission d'examen

Membres du Jury :

Président : M. F. MANGENOT

Examineurs : MM. J. GARNIER

G. VIENNOT-BOURGIN,

*Membre de l'Académie d'Agriculture
Professeur à l'I.N.A.*

THÈSE

présentée à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Mohamed HESTI

Ingénieur diplômé



Recherches concernant l'écologie, la morphologie
et la physiologie de l'agent du "Corky Root"

Soutenue le 23 Novembre 1970 devant la Commission d'examen

Membres du jury :

M. E. MARCHAND

Président

M. J. CARPENTIER

Examinateur

E. VERMOREL-BOURGER

École de l'Industrie et du Commerce
Nancy 1970

UNIVERSITE DE NANCY

FACULTE DES SCIENCES

ANNEE SCOLAIRE 1970-71

DOYEN : M. AUBRY

ASSESSEUR : M. GAY

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT - ROUBAULT

Professeurs honoraires : MM RAYBAUD - LAFFITTE - LERAY - JOLY - LAPORTE
EICHEBORN - CAPELLE - GODEMENT - DUBREIL - L. SCHWARTZ - DIEUDONNE -
LETORT - DODE - GAUTHIER - GOUDET - OLMER - CORNUBERT - CHAPELLE -
GUERIN - WAHL

Maître de Conférences honoraires : MM. LIENHART - PIERRET

PROFESSEURS.

MM. ROUBAULT	Géologie		HADNI	Physique
VEILLET	Biologie Animale	+	BASTICK	Chimie
BARRIOL	Chimie Théorique		DUCHAUFOR	Pédologie
BIZETTE	Physique		GARNIER	Agronomie
GUILLIEN	Electronique		NEEL	Chimie Organique In
LEGRAS	Mecanique Rationnelle		BERNARD	Géologie Appliquée
BOLFA	Minéralogie	+	CHAMPIER	Physique
NICLAUSE	Chimie	+	GAY	Chimie Biologique
FAIVRE	Physique Appliquée		STEPHAN	Zoologie
AUBRY	Chimie Minérale	+	CONDE	Zoologie
COPPENS	Radiogéologie	+	WERNER	Botanique
DUVAL	Chimie		EYMARD	Calcul Différentiel & Intégral
FRUHLING	Physique		FELDEN	Physique
HILLY	Géologie		GOSSE	Mécanique Physique
LE GOFF	Génie Chimique	+	DAVOINE	Physique (ENSMIN)
SUHNER	Physique expérimentale	+	HORN	Physique (1° Cycle
CHAPON	Chimie Biologique		ROCCI	Géologie
HEROLD	Chimie Minérale Indust.	+	Me LUMER	Maths
SCHWARTZ B.	Exploitation Minière		DELPUECH	Chimie Physique
+ MALAPRADE	Chimie		Mlle HUET	Analyse Supérieure
MANGENOT	Botanique		BLAZY	Minéralogie Appliqu
GAYET	Physiologie		CAUBERE	Chimie Organique
			VUILLAUME	Psychophysiologie
			ALAIS	Chimie Biologique

N....	Mécanique Appliquée
N....	Méthodes Mathématiques de la Physique
N....	Mécanique Rationnelle

(+) Professeur titulaire à titre personnel.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mme BASTICK	Chimie P.C. EPINAL	JANOT	Physique P.C. EPINAL
MM GUDEFIN	Physique	CACHAN	Entomologie appl. (ENSA)
FRENTZ	Biologie Animale	JACQUIN	Pédologie & Chimie agri.
MARI	Chimie (ISIN)	MAINARD	Physique M.P.
DEVIOT	Physique du Solide	MARTIN	Chimie P.C.
FLECHON	Physique P.C.	PAULMIER	Mécanique Expérimentale
VIGNES	Métallurgie	PROTAS	Minéralogie
JURAIN	Géologie C.B.G.	RIVAIL	Chimie Appliquée (GUCES)
BALESDENT	Thermodynamique, Chimie Appliquée (ENSIC)	DEPAIX	Probabilités et Statistiques.

MAITRES DE CONFERENCES

MM. VILLERMAUX	Génie chimique	CASTRO	Chimie organique
METCHE	Biochimie appliquée (Brasserie)	DEXHEIMER	Botanique
BAUMANN	Physique 1 ^o Cycle	NOVERRAZ	Mathématiques
DURAND	Physique	TOURET	Géologie
GRANGE	Physique (ISIN)	MALENGE	Chimie (ENSIC)
BAVEREZ	Chimie (ENSIC)	GROSS	Chimie organique
CHAMBON	Exploitation Minière (Mines)	LOCHON	Chimie organique
HUSSON	Physique (ENSEM)	N....	Maths appliquées
WEISSLINGER	Physique	N....	Mathématiques
GERL	Physique (MINES)	N....	Mathématiques
ROQUES	Chimie Minérale	N....	Physiologie animale.
FERRIER	Mathématiques	N....	Laiterie (Ecole Lai.)
GILORMINI	Mécanique flui. ISIN	N....	Maths appliquées
HILY	Mathématiques P.C.	N....	Pétrographie
		N....	Mathématiques
		N....	Physique (aérotherm.)
		N....	ISIN

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. AMARIGLIO - COEURE - DEVRAINVILLE - GIRARDEAU - OVAERT - RUYER -
VEBER - PUJOL - SCHREIBER - GEORGES - MARTIN - WEISBROD.

En me proposant ce travail dans son laboratoire et en me guidant au cours de ces deux années de recherches, Monsieur le Professeur MANGENOT n'a cessé de me prodiguer ses encouragements et ses conseils très éclairés. Je suis très heureux d'assurer mon Maître de ma profonde reconnaissance et de mon très sincère attachement.

Ma reconnaissance s'adresse aussi à Monsieur le Professeur GARNIER qui a accepté de s'intéresser à mon travail et de le juger.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur VIENNOT-BOURGIN, membre de l'Académie d'Agriculture, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à mes travaux, et je suis très honoré de le voir compter parmi les membres du jury.

J'adresse mes remerciements à Monsieur DELACOUR qui a aimablement mis ses serres à ma disposition, à Monsieur WALK et à Monsieur CLERJEAN qui m'ont fait parvenir diverses semences de *Lycopersicon*.

Mes remerciements s'adressent enfin à tous mes camarades de laboratoire pour leur amicale collaboration.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : L'AGENT, LES SYMPTOMES, LA MALADIE ET LA LUTTE.

Chapitre I : L'agent pathogène. Page :

A - Morphologie de <u>Pyrenochaeta lycopersici</u> Schneider et Gerlach.	1
I - Mycelium.	1
II - Sclérotés.	2
III - Pycnides.	2
IV - Variations d'ordre morphologique.	3
V - Influence de l'humidité.	4
I - Influence de la température.	4
II - Influence du pH.	4
III - Influence du milieu de culture.	5
IV - Stabilité du pouvoir pathogène.	5
V - Conservation du champignon.	5

Chapitre II : Epidémiologie.

A - Symptômes de la maladie.	6
I - Symptômes dûs à <u>P. lycopersici</u> .	6
II - Symptômes dûs aux mauvaises conditions du milieu.	7
1) Excès NH_3 .	7
2) Structure du sol	7
3) Salinité	7
B - Différentes plantes hôtes.	7
C - Interactions avec d'autres parasites.	7
I - Nématodes.	8
II - <u>Colletotrichum coccodés</u> (Wallr.) Hugues.	8
D - Importance relative des symptômes.	9
E - Importance de l'inoculum.	9

Chapitre III : Méthodes de lutte.

A - Rotations.	11
B - Façons culturales.	11

I - Augmenter le volume de la motte de terreau.	12
II - Stérilisation.	12
1) Stérilisation à la vapeur.	12
2) Stérilisation chimique.	13
C - Variétés résistantes.	14
D - Comparaison greffe-stérilisation	15
<u>Conclusion.</u>	16

DEUXIEME PARTIE : CONSERVATION DANS LE SOL ET COLONISATION DE LA PLANTE

Chapitre I : *P. lycopersici* dans le sol.

A - Vie saprophyte.	19
I - Matériel et méthodes.	19
1) Méthode de Cambridge.	21
2) Méthode de Park.	24
3) Disques de culture gélosée.	25
II - Résultats.	25
III - Conclusion et discussion.	31
B - Mode et sites de conservation de <u><i>P. lycopersici</i></u> .	33
I - Matériel et méthodes.	34
1) Survie dans les racines conservées au laboratoire.	34
2) Survie dans les débris de racines retirés du sol.	34
3) Survie du mycelium.	35
4) Survie des sclérotés.	36
II - Résultats.	36
III - Conclusion et discussion.	39
C - Interactions avec certains microorganismes du sol.	42
I - Matériel et méthodes.	42
II - Résultats.	43
III - Conclusion et discussion.	45

Chapitre II : L'infection des racines.

A - Contamination des racines.	48
I - Matériel et méthodes.	48
II - Résultats.	49
III - Conclusion et discussion.	50
B - Progression dans les racines.	50
I - Matériel et méthodes	51

II - Résultats.	52
III - Conclusion et discussion.	53
C - Etude anatomique des lésions.	54
I - Matériel et méthodes.	54
1) Mise en évidence du mycelium dans la racine	55
2) Mise en évidence du suber.	55
3) Mise en évidence de la lignine.	55
II - Résultats.	56
1) Observations générales.	56
2) Extension de la maladie-symptômes.	57
3) Identifications histochimiques.	58
III - Conclusion et discussion.	60
D - Succession de différents champignons sur les racines.	62
I - Matériel et méthodes.	62
1) Succession de <u>P. lycopersici</u> , <u>C. coccodés</u> et <u>F. oxysporum</u> .	62
2) Variations morphologiques de <u>P. lycopersici</u> .	63
3) Croissance mycelienne linéaire de <u>C. coccodés</u> , <u>F. oxysporum</u> et <u>P. lycopersici</u> .	64
II - Résultats.	64
III - Conclusion et discussion.	69
E - Sensibilité variétale.	70
I - Matériel et méthodes.	71
1) Plantes de 12 jours.	71
a) variétés cultivées.	71
b) Espèces et variétés sauvages.	72
2) Plantes de quatre mois.	73
II - Résultats.	75
III - Conclusion et discussion.	81

TROISIEME PARTIE : QUELQUES INTERACTIONS HOTE-PARASITE

Chapitre I : Techniques et conditions expérimentales.

A - Généralités sur les méthodes respirométriques.	84
I - Préparation des fioles.	84
1) Mesure de la respiration.	84
2) Mesure de l'activité PPO	85

3) Mesure de l'activité AO.	85
II - Mise en température des fioles.	85
III - Mesure proprement dite.	85
B - Perturbations physiologiques de l'hôte.	86
I - Altération de la respiration	86
1) En fonction du développement de la plante et des symptômes.	86
a) Obtention des racines.	86
b) Préincubation des racines.	86
2) En fonction de la sensibilité variétale.	86
3) Influence des filtrats de culture.	87
a) Obtention des filtrats de culture.	87
b) Obtention des racines.	87
c) Mise en incubation des racines.	87
II - Variations des activités PPO et AO au cours de la manifestation des symptômes.	88
1) Préparation des extraits enzymatiques.	88
2) Présence de RH_2 .	88
3) Influence de l'acide ascorbique sur l'oxydation du catéchol.	89
4) Spécificité de la PPO.	89
III - Variation des activités PPO, AO et sensibilité variétale.	90
C - Tolérance de <u>P. lycopersici</u> aux réactions de défense de la plante et sa participation à la manifestation des symptômes.	90
I - Toxicité des phénols.	90
II - Activité PPO de <u>P. lycopersici</u>	91
1) Obtention du filtrat de culture.	91
2) Obtention de l'extrait mycelien.	91
3) Autooxydation des phénols.	92
III - Production d'une β . glucosidase par <u>P. lycopersici</u> .	92
<u>Chapitre II : Perturbations physiologiques de l'hôte.</u>	
A - Altération de la respiration.	94
I - En fonction du développement de la maladie et des symptômes.	95
1) Résultats	95
2) Conclusion et discussion.	97
II - En fonction de la sensibilité variétale.	98
1) Résultats.	98
2) Conclusion et discussion.	100

	Page :
III - Influence du filtrat de culture de <u>P. lycopersici</u> .	101
1) Résultats.	101
2) Conclusion et discussion.	102
B - Variations des activités PPO et AO au cours de la manifesta- tion des symptômes.	103
I - Résultats.	104
1) Activité PPO.	104
2) Activité AO.	106
3) Présence de corps réducteurs.	107
4) Influence de l'acide ascorbique sur l'oxydation du catéchol.	108
5) Spécificité de la PPO.	109
II - Conclusion et discussion.	112
C - Variations des activités PPO, AO et sensibilité variétale.	115
I - Résultats.	115
II - Conclusion et discussion.	117
<u>Chapitre III : <u>Effets de P. lycopersici</u> aux réactions de défense</u> <u>de la plante et sa participation à la manifestation</u> <u>des symptômes.</u>	
A - Toxicité des phénols.	119
I - Résultats.	120
II - Conclusion et discussion.	121
B - Production d'une PPO par <u>P. lycopersici</u> .	122
I - Résultats.	123
1) Autooxydation des phénols.	123
2) Activité PPO.	124
a) PPO intracellulaire.	124
b) PPO diffusible.	125
II - Conclusion et discussion.	127
C - Production d'une <u>β. glucosidase</u> par <u>P. lycopersici</u> .	129
I - Résultats.	129
II - Conclusion et discussion.	131
<u>CONCLUSION GENERALE ET ORIENTATIONS FUTURES.</u>	

INTRODUCTION

L'agent responsable de la maladie des racines liègeuses de tomate a dérouté les phytopathologistes pendant plusieurs années. Les symptômes ont été décrits, différentes hypothèses ont été émises quant à l'agent ou cause responsable.

La maladie a été trouvée en Hollande (Corky root), en Allemagne (Korkwanzel, Wurzelbraune), au Danemark (Brune rodder), en Norvège (Korkrot), en Suède, Finlande, France, Angleterre, Liban (Brown root rot = BRR, Corky root), au Canada (Basal rot).

WILLIAMS (1929) a isolé un champignon gris et stérile, mais les expériences d'inoculation ont été négatives.

Des similitudes et ressemblances anatomiques ont poussé KLINKINBERG (1940) à supposer que le BRR du Tabac et de la Tomate comme les décrit JOHNSON (1939) peuvent être dûs au même organisme.

RICHARDSON et BERKELEY (1944) au Canada, montrent qu'un champignon gris et stérile, identique à celui isolé par WILLIAMS (1929) est toujours associé avec les symptômes caractéristiques du BRR.

JENKINS (1948) a rendu le nématode Pratylenchus pratensis responsable du BRR du tabac.

ROLL-HANSEN (1952) suppose que Cylindrocarpon radicicola Wollen est l'un des responsables de la maladie.

HEIMBECK (1954) observe des bactéries toujours associées aux racines liégeuses.

Des travaux en Angleterre (EBBEN et WILLIAMS 1953) montrent que la maladie est due à l'association de plusieurs champignons comme Colletotrichum coccodés (Wallr.) Hugues, Chaetomium sp, Cephalosporium sp, Volutella ciliata fr, et un champignon gris et stérile : GSF = grey stéril fungi.

LAST et EBBEN (1963) réduisent le complexe du BRR à deux champignons : GSF et Colletotrichum coccodés (Wallr.) Hugues

TERMOHLEN (1962) en combinant dans ses expériences d'inoculation différents champignons isolés à partir de racines de tomates, conclut que les symptômes du "Corky root" n'apparaissent que lorsque G S F est introduit dans la combinaison. Il démontre ainsi que le seul agent responsable est un champignon gris et stérile.

La position systématique du GSF a été établie par GERLACH et SCHNEIDER (1964), SCHNEIDER (1965), GERLACH et SCHNEIDER (1966), SCHNEIDER et GERLACH (1966). Ces auteurs ont obtenu des pycnides de Pyrenochaeta (Deuteromycète, Sphaeropsidale) par la méthode de HESS (1962). Des comparaisons avec P. terrestris les ont conduit à créer une nouvelle espèce : Pyrenochaeta lycopersici SCHNEIDER et GERLACH.

Ce bref historique de la maladie nous a permis de retracer les différentes étapes dans la recherche et la détermination de l'agent responsable. Aussi, essayerons nous dans la première partie de notre travail de faire la synthèse des différents travaux effectués jusqu'à ce jour sur l'agent, les symptômes et les méthodes de lutte.

Nos travaux personnels représenteront la deuxième et troisième partie.

Nous avons adopté le plan suivant :

Ile partie : conservation de P. lycopersici dans le sol et colonisation de la plante

- chapitre I : P. lycopersici dans le sol
- Chapitre II : L'infection des racines

IIIe partie : quelques aspects des interactions hôte-parasite

- Chapitre I : Techniques et conditions expérimentales
- Chapitre II : Perturbations physiologiques de l'hôte
- Chapitre III : Tolérance de P. lycopersici aux réactions de défense de la plante et sa participation à la manifestation des symptômes.

PREMIERE PARTIE

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES: L'AGENT, LES SYMPTOMES
DE LA MALADIE ET LA LUTTE.

CHAPITRE I

L'AGENT PATHOGENE

=====

Les champignons stériles ou les champignons ne fructifiant pas en culture sont une source constante de confusion pour les chercheurs (PARMENTER 1965). Quand ils les rencontrent, les différents auteurs ont plusieurs possibilités : les identifier parmi les "Mycelia sterilia" déjà connus, en faire un nouveau genre ou une nouvelle espèce, ou bien essayer d'en faire une description aussi complète que possible sans leur donner de position systématique. C'est cette dernière formule qui a été utilisée pour l'agent du "Corky root" jusqu'en 1964.

A- Morphologie de P lycopersici Schneider et Gerlach

I - Mycelium

RICHARDSON et BERKELEY (1944) au Canada ont reconnu un champignon gris et stérile responsable de la maladie. Le mycelium jeune a 2-4 u d'épaisseur. Il est faiblement ramifié et peu septé. Il forme des plages étroites d'hyphes parallèles et agglomérées. Avec l'âge, il devient plus grossier, plus sombre, de 4 à 8 u d'épaisseur, en prenant l'aspect d'une chaîne de "chlamydospores".

TERMOHLEN (1967) en Hollande décrit un champignon morphologiquement identique. Le mycelium aérien et cotonneux s'élevant de 0,4 cm au-dessus du milieu de culture. La couleur du mycelium varie de clair à gris sombre, le revers de la colonie de vert-grisâtre à noir verdâtre, et il est parfois brun noirâtre. Des types de couleur différente peuvent être isolés à partir d'un même fragment de racine.

Le mycelium jeune a 2 à 4 u d'épaisseur, peu septé. Cet auteur suppose que les cellules oblongues (3-8 u x 10-18u) du mycelium âgé (7-10 u) constituent le début de la formation des sclérotés.

II - Sclérotés :

RICHARDSON et BERKELEY (1944), EBBEN et WILLIAMS (1953, 1956) n'ont pas mentionné la présence de sclérotés dans leurs travaux. Par contre, les derniers auteurs ont noté dans certaines boîtes de culture la formation de pycnides de Pyrenochaeta sp.

TERMOHLEN (1957) obtient dans ses cultures de deux à trois semaines des sclérotés noirs ayant 100 à 400 u de longueur. Ceux observés par PREECE (1964) atteignent 550 u. Des coupes transversales de racines liégeuses n'ont jamais révélé la présence de sclérotés dans les cellules, cependant, des coupes longitudinales ont permis à PREECE (1964) d'observer des structures morphologiquement identiques aux sclérotés produits sur PDA (Potato-Dextrose-Agar), contre les parois des cellules juxtaposées aux tissus sains.

III - Pycnides

Récemment, GERLACH et SCHNEIDER (1964, 1966) ont réussi à faire fructifier le GSF. Des études comparatives avec P. terrestris, agent du "Pinkroot" de l'oignon, ont révélé que les deux champignons ont des caractères morphologiques distincts.

Le tableau suivant donne les mensurations des conidies et le diamètre des pycnides en microns.

	conidies		Pycnides
	longueur	largeur	diamètre
<u>P. lycopersici</u>	4,3 - 5,2	1,1 - 1,6	100 - 200
<u>P. terrestris</u>	5 - 6,2	1,6 - 2,2	150 - 400

D'après ces mêmes auteurs, les pycnides de P. lycopersici sont dispersées, solitaires ou en groupe, sphériques ou légèrement aplaties, sombre à noir, de 100 à 200 u de diamètre.

Autour de l'ostiole papilliforme, se trouvent des soies allongées, de 300 à 700 u de long et 3-5 u de large. La paroi de la pycnide (15 à 25 u d'épaisseur) est composée d'un plus ou moins grand nombre de couches de cellules. Ces dernières sont polyédriques et plus sombres vers l'extérieur. Elles sont plus claires, plus petites et à paroi plus mince vers l'intérieur.

Les conidiophores (20 à 100 u de long) tapissent toute la surface de la paroi, et sont pour la plupart filiformes, cloisonnés, ramifiés ou simples. Les conidies sont acrogènes ou pleurogènes, oblongues ou étroitement ellipsoïdes, droites ou légèrement recourbées, hyalinés et de dimension 4,4 - 5,1 x 1,2 - 1,5 (3,8 x 1,2).

IV - Variations d'ordre morphologique : cf Planche V

Les souches de P. lycopersici diffèrent par la couleur, le taux de croissance, la présence ou l'absence de sclérotés et la pathogénie (TERMOHLEN 1962, RISSER et LAUGIE 1968).

Plusieurs souches peuvent être isolées à partir d'un même fragment. La présence de souches non pathogènes s'explique par le fait que la souche pathogène pénètre en premier, suivie par les non pathogènes (TERMOHLEN 1962).

Cette plus ou moins grande virulence des souches est la raison majeure des échecs de WILLIAMS (1929), RICHARDSON et BERKELEY (1944) dans leurs expériences d'inoculation.

B- Biologie de Pyrenochaeta lycopersici

A notre connaissance, la seule étude sur la biologie de P. lycopersici a été faite par TERMOHLEN (1962). Aussi, rapporterons nous ses principaux résultats.

I - Influence de la température :

La température optimale de croissance du champignon sur milieu aux cerises est de 26°, la température minimale de 8°, et la température maximale de 32°.

La température létale pour le mycelium provenant d'une culture est située entre 40 et 50°. Elle est de 100° lorsqu'il se trouve dans les tissus racinaires ou dans un sol relativement sec. Les sclérotés ne commencent à être tués qu'après un traitement de 75 mn à 100°.

La température optimale du sol favorable à l'infection se situe entre 15° et 20°. Au-dessus de 18°, le taux d'infection diminue avec l'augmentation de la température.

II - Influence du pH :

Sur un milieu de Czapek, la croissance optimale du champignon a lieu pour un pH = 4,7 - 5. Elle est fortement inhibée au-dessus de pH = 7.

L'effet du pH sur l'attaque dans le sol est à peu près analogue. Après 9 semaines de culture, à pH = 4,7, le % d'attaque est de 62%. A pH = 7,7, il n'est plus que de 40%.

III - Influence du milieu de culture

La croissance du champignon est plus rapide sur un sol stérile que sur un milieu gélosé à l'extrait de cerises.

Le sol, comparé au sable, perlite ou vermiculite, constitue un milieu idéal pour les expériences d'inoculation.

L'utilisation de la tourbe diminue le taux d'infection.

IV - Stabilité du pouvoir pathogène

La perte de pathogénie est faible quand une culture est maintenue par repiquages successifs. Si la souche est conservée dans le sol, la pathogénie peut être maintenue en ajoutant périodiquement l'eau perdue par évaporation.

V - Conservation du champignon

Le champignon se conserve sous forme de mycelium et de sclérotas dans les débris racinaires (PREECE 1964).

Le fait qu'une poudre de racines liégeuses conserve son pouvoir infectieux pendant plus d'une année, et le fait que le champignon puisse être réisolé à partir d'un sol stérile conservé au sec pendant cinq ans suggèrent la présence de sclérotas (TERMOHLEN 1962).

EPIDEMIOLOGIE .

A- Symptômes de la maladie : cf Planches I et II.

I - Symptômes dûs à P. lycopersici :

Les termes anglais Brown root rot (BRR) et Corky root sont significatifs et montrent l'état du système racinaire des plantes de tomates attaquées.

Les plantes affectées par le BRR sont rarement tuées. Cependant, elles manquent de vigueur, leur rendement est fortement diminué (BRAVENBOER et PET 1962, LAST et EBBEN 1966). Lorsque l'attaque est très importante, les plantes se flétrissent par temps chaud et ensoleillé (LAST et EBBEN 1963).

EBBEN et WILLIAMS (1956) ont décrit trois types de lésions :

- lésions corticales sur les racines fines entraînant leur décortication : "Cortical shredding".
- formation de liège sur les grosses racines avec développement d'une écorce brunâtre et profondément cannelée : "Corkiness". La décortication des grosses racines n'est jamais observée.
- lésions brunâtres à la base de la tige : "basal stem rot".

La décortication des jeunes racines apparaît en mars, quelques jours après la plantation. Les racines liégeuses et le "basal stem rot" ne sont observés respectivement qu'en juillet et septembre (EBBEN et WILLIAMS 1956).

II - Symptômes dûs aux mauvaises conditions du milieu

1) Excès de NH_3

COOKE (1962) a montré que des lésions racinaires brunes peuvent résulter d'une accumulation de NH_3 , issue de l'hydrolyse de l'urée.

ULJEE (1964) décrit des symptômes analogues au BRR, sans pouvoir associer cette maladie à un agent pathogène. Il conclut à une accumulation de NH_3 dans les sols traités à la vapeur.

2) Mauvaise structure du sol :

TERMOHLEN (1962) a noté un brunissement des racines dû à une déficience du sol en O_2 .

3) Salinité

Dans les sols excessivement salins, les racines sont plasmolysées. Des nécroses semblables à celles du BRR apparaissent quelques temps après un arrosage (TERMOHLEN 1962).

B- Différentes plantes hôtes :

P. lycopersici est capable de coloniser les racines de nombreuses plantes.

CHESTERS et HORNBY (1965) l'isolent à partir de racines de crucifères, cucurbitacées, solanacées, légumineuses.

TERMOHLEN (1962) montre que 27 espèces différentes de solanacées sont sensibles.

RISSER et LAUGIE (1968) signalent ce champignon sur l'aubergine et le melon.

C- Interactions avec d'autres parasites :

I - Nématodes

LAST et EBBEN (1963) ont suggéré une interaction possible entre le GSF et les nématodes. Lorsque les plantes de tomate poussent dans un sol infesté par Heterodera rostochiensis Woll, les dégats causés sont bien plus importants.

JAMES (1966,1968) a montré que P. lycopersici produit une substance qui réduit l'émergence des larves de nématodes. Ces derniers sont incapables de se reproduire sur des plantes en serre, quoiqu'ils pénètrent dans les racines.

GRAHAM (1966) signale que dans une serre ou P. lycopersici et Heterodera rostochiensis sont présents, la population des nématodes reste à un niveau bas.

II - Colletotrichum coccodés (Wallr.) Hugues :

L'étude des microorganismes colonisant les racines de tomate s'est limitée pendant longtemps à une numération de populations à la fin de la période végétative. Aussi, la part que joue C. coccodés dans cette maladie a été longtemps discutée.

Le champignon est l'agent responsable du "root rot" des tomates, entraînant une forte diminution du rendement (WILLIAMS 1929, COLQUHOUN 1941, Mc KAY 1942, MAC NEILL 1955).

C. coccodés est rarement isolé des racines jeunes en serre. L'attaque des plantes plus âgées est suivie par un développement rapide de sclérotés (black dot) sur le cylindre central après

décortication des jeunes racines, sur l'écorce craquelée des racines plus âgées et à la base de la tige (LAST et coll 1966).

LAST et EBBEN (1966) ont montré qu'une attaque aussi tardive ne peut influencer sur le rendement. Ils apportent ainsi l'évidence que C. coccodés a un faible rôle à jouer dans la maladie.

D- Importance relative des symptômes :

EBBEN et WILLIAMS (1956) ont montré que la gravité de la maladie est directement associée à l'importance des lésions brunes pendant les trois premiers mois de végétation. Ils ont établi une relation inverse entre le % de BRR pendant les neuf premières semaines et le rendement.

LAST et coll (1969) concluent que l'examen précoce de jeunes racines (5 à 10 semaines) peut donner une idée sur la gravité de l'attaque et sur la nécessité et l'importance de la stérilisation à effectuer à la fin de la récolte.

E- Importance de l'inoculum :

Lorsque le taux d'inoculum dans le sol est important, l'attaque du système racinaire est plus précoce. La destruction rapide des jeunes racines entraîne une diminution du pourcentage de racines liégeuses (LAST et EBBEN 1966, LAST et coll 1969).

Ce phénomène est généralement observé dans des serres non stérilisées, et portant des tomates tous les ans.

CHAPITRE III.

METHODES DE LUTTE

En serre, les cultures de tomate reviennent généralement tous les ans sur le même sol et dans la même ambiance. L'augmentation du taux d'inoculum dans le sol oblige parfois les maraîchers à déplacer leur serre ou à en changer la terre. Mais généralement, on fait appel à des méthodes moins extrêmes.

A- Rotations :

A partir d'expériences de rotations incluant des cultures de concombres, choux fleurs, laitues, endives et fraises, alternant avec des cultures de tomates tous les deux ans, TERMOHLEN (1962) montre que les rotations ont un effet négligeable sur la diminution du taux d'inoculum dans le sol.

Les rotations de culture ne peuvent être utilisées comme moyen de lutte contre P. lycopersici, car d'une part, ce champignon se conserve très longtemps dans le sol (TERMOHLEN 1962), d'autre part, la plupart des cultures en serre peuvent servir d'hôte au parasite.

B- Façons culturales :

Les quelques connaissances que nous avons sur la biologie de P. lycopersici peuvent nous permettre de diminuer les dégâts. TERMOHLEN (1962), EBBEN et WILLIAMS (1966) ont montré, que le rendement est d'autant plus faible que l'attaque est plus précoce, et que le champignon a une croissance très lente.

Il est donc logique de penser qu'il est possible de retarder l'infection en empêchant les racines de venir en contact avec le parasite. Ce résultat peut être obtenu de deux manières.

I - Augmenter le volume de la motte de terreau :

Dans la culture de Tomate, les graines sont mises à germer au préalable dans des mottes de terreau. Les jeunes plantes obtenues (généralement de 7 semaines) sont ensuite repiquées en serre.

LARGE (1965), LAST et coll (1966) ont obtenu des augmentations de rendement appréciables avec cette méthode.

Un examen du système racinaire de plantes âgées de deux à trois mois montre deux zones distinctes : des racines saines dans la motte, et des racines attaquées à l'extérieur de la motte. La limite entre ces deux zones diminue jusqu'à disparaître à la fin de la période végétative par décomposition de la motte.

II - Stérilisation

1) Stérilisation à la vapeur :

La température létale pour le mycelium est de 40 à 50° (WELVAERT et VELDEMAN 1961, TERMOHLEN 1962). Une stérilisation adéquate peut donc retarder l'attaque des plantes en diminuant le taux d'inoculum dans l'horizon supérieur (0 - 20 cm) (BRAVENBOER 1955, DAWSON et coll 1965, LAST et coll 1968). Ces derniers auteurs ont montré que dans un sol stérilisé à la vapeur, les racines développent d'avantage de liège que dans un sol non stérilisé. Dans ce dernier cas, les jeunes racines sont rapidement détruites.

Il est nécessaire de répéter ce traitement annuellement car en plus de son effet direct, la vapeur a un effet résiduel (LAST et coll 1968) permettant d'améliorer le rendement des années futures.

2) Stérilisation chimique :

BRAVENBOER (1955), LAST et EBBEN (1963) ont obtenu le meilleur contrôle en traitant le sol avec de la chloropicrine. Cependant, ce produit ne peut être utilisé comme fongicide courant, car d'une part, les gaz qui s'échappent sont très phytotoxiques, d'autre part, le repiquage des plantes ne peut être fait que deux à six semaines après le traitement.

READ (1960, 1964) a obtenu des résultats analogues en employant la chloropicrine et la vapeur.

TERMOHLEN (1962) a testé des désinfectants demandant un temps d'attente plus court comme le formol, le quintazène, le ferbam, le DD. Ces produits se sont révélés inefficaces.

JAMES et HAGUE (1967), en étudiant l'influence du bromure de méthyle sur Pyrenochaeta lycopersici et Heterodera rostochiensis, ont montré que ce produit affecte uniquement le développement du nématode.

Le traitement à la vapeur reste encore le moyen le plus pratique et le plus efficace pour diminuer l'importance des dégâts.

L'introduction récente d'une méthode d'enrichissement en CO_2 de l'atmosphère peut ouvrir des perspectives de lutte. Nous ignorons encore comment ce gaz peut influencer sur l'infection, mais nous savons que le rapport système racinaire-système aérien est d'autant plus important que le taux en CO_2 est élevé. Il est donc possible que des plantes ayant un système racinaire développé puissent tolérer une attaque plus importante.

C- Utilisation de variétés résistantes.

Les espèces sauvages du genre Lycopersicum (L. hirsutum, L. glandulosum, L. pimpinellifolium, L. peruvianum) sont utilisées pour lutter contre les maladies fongiques, bactériennes ou virales, soit comme porte-greffe, soit pour la création de nouvelles variétés (DOOLITTLE 1954).

TERMOHLEN (1962), BRAVENBOER et PET (1962), ont testés plus de cent espèces de Solanacées. Quoique certaines se soient révélées très résistantes, elles n'ont pas pu être utilisées comme porte-greffe à cause de leur incompatibilité avec le greffon, de leur faible croissance et du faible rendement obtenu.

Cependant, le greffage n'est pas encore devenu une pratique courante, et ceci pour plusieurs raisons::

- la qualité du fruit est inférieure (LAST et EBBEN 1966)
- le greffage ne peut être utilisé pour les tomates précoces plantées en janvier, car la production des plantes greffées commence bien plus tard que celles des plantes non greffées (BRAVENBOER et PET 1962).
- l'opération de greffage doit être faite en un minimum de temps et demande un long travail.

Les méthodes de greffage ont été décrites par SMITH et PROCTOR (1965).

A l'intérieur du genre Lycopersicum, BRAVENBOER et PET (1962) ont procédé au croisement de plusieurs espèces en utilisant l'espèce sauvage comme parent mâle. Un des hybrides (L. esculentum x L. hirsutum) montre un haut degré de résistance à P. lycopersici.

Plusieurs auteurs tentent de créer de nouvelles variétés de tomate en essayant de transférer les gènes de résistance des espèces sauvages aux variétés commerciales. SZTEYN (1962) travaille sur L. Glandulosum, SMITH et PROCTOR (1966) sur L. hirsutum.

D- Comparaison greffe-stérilisation :

Il est important de savoir en matière de production quelle est la méthode de lutte qui donne le meilleur résultat.

BRAVENBOER et PET (1962), LAST et coll (1966) ont montré que la production des plantes greffées, bien que plus tardive, est au moins égale à la production de plantes en sol traité à la vapeur ou à la chloropicrine.

CONCLUSION

De cette étude préliminaire effectuée sur la "maladie des racines liégeuses de tomate", on peut déduire que malgré les nombreuses difficultés rencontrées, un grand pas a été effectué depuis les premiers travaux de WILLIAMS (1929). Nous pensons que ces difficultés sont de quatre ordres :

- L'agent responsable est un champignon stérile. Or, les champignons stériles passent souvent inaperçus (PARMETER 1965), car d'une part, leur identification n'est pas aisée, d'autre part, même pour des champignons connus et décrits, la seule observation du mycelium ne peut permettre de déterminer avec certitude leur appartenance (MOREAU et MOREAU 1956, WHITNEY et coll 1964).

- La grande diversité dans la pathogénie des souches explique les résultats négatifs de nombreux auteurs lors de leurs expériences de reproduction des symptômes (WILLIAMS 1929, RICHARDSON et BERKELEY 1944).

- Le champignon est toujours associé à certains parasites ou saprophytes connus. Les travaux se sont donc orientés dans la recherche de l'agent responsable parmi ces microorganismes : Pratylenchus pratensis (JENKINS 1948), Cylindrocarpon radicicola (ROLL-HANSEN 1952), bactéries (HEIMBECK 1954), complexe du BRR (EBBEN et WILLIAMS 1953).

- La Tomate est un hôte très capricieux et n'est pas très facile à obtenir au laboratoire.

P. lycopersici, par sa morphologie mycelienne, par sa longue

.../...

conservation dans le sol, par la diversité des plantes hôtes (dont la plupart sont des plantes maraîchères en serre) et par la baisse considérable du rendement, est considéré à juste titre par plusieurs auteurs (BRAVENBOER 1962, EBBEN et WILLIAMS 1953, TERMOHLEN 1962) comme étant le parasite le plus important des tomates en serre. Aussi, différents travaux sur les moyens de traitement du sol, de sélection variétale ont été effectués ou sont en cours afin d'éliminer complètement le pathogène.

Nos travaux personnels sont consacrés à l'étude du parasite dans le sol et dans la plante. Aussi, les avons nous divisés en deux sections bien distinctes.

- la deuxième partie de notre exposé est consacrée à la conservation de P. lycopersici dans le sol (vie saprophyte, mode et sites de survie, interactions avec certains microorganismes du sol) et à l'infection de la plante (contamination des racines, progression dans les racines, étude anatomique des lésions, succession de différents champignons, sensibilité variétale).

- la troisième partie de ce mémoire traite de quelques interactions entre l'hôte et le parasite, à savoir l'altération de la respiration des tissus attaqués, les variations des activités polyphénol oxydase (PPO) et ascorbique oxydase (AO) au cours de la manifestation des symptômes ; les variations de ces deux enzymes et leur relation avec la sensibilité variétale, enfin, la tolérance du parasite aux réactions de défense de la plante et sa participation dans la manifestation des symptômes.

La deuxième partie de notre travail fait appel à des méthodes et à des techniques d'étude différentes suivant les expériences. Aussi, les avons nous décrites au début de chaque étude. Par contre, pour la troisième partie, nous avons essentiellement fait appel à des méthodes respirométriques, méthodes que nous décrirons dans un premier chapitre.

DEUXIEME PARTIE

CONSERVATION DE P. LYCOPERSICI SCHNEIDER ET GERLACH
DANS LE SOL ET COLONISATION DE LA PLANTE.

CHAPITRE I.

PYRENOCHAETA LYCOPERSICI SCHNEIDER ET GERLACH DANS LE SOL

En l'absence de la plante hôte, les agents pathogènes peuvent survivre dans le sol sous différentes formes et dans des sites très divers (PARK 1965).

Il est certain qu'après l'arrachage des plantes de Tomates, les racines persistant dans le sol meurent rapidement. Le parasite commence alors dans la deuxième phase de son cycle, qui se déroule dans des conditions très différentes de celles présentes dans les racines vivantes.

La persistance dans le sol de microorganismes parasites peut être de deux sortes (GARRETT 1956).

- Certains agents pathogènes peuvent entrer en compétition avec les autres microorganismes du sol pour la colonisation des substrats morts. De tels champignons sont des parasites primaires et sont désignés par GARRETT (1956) comme des "soil inhabiting fungi".

- D'autres agents plus spécialisés et désignés comme des "root inhabiting fungi" ne peuvent réaliser cette colonisation. Cependant, ces derniers peuvent survivre dans les tissus morts de l'hôte, tissus dans lesquels le champignon s'est installé pendant sa phase parasitaire.

Nos connaissances actuelles sur le comportement saprophytique dans le sol de la plupart des parasites des racines sont encore limitées. Or, comme l'ont fort bien souligné GARRETT (1956) et PARK (1965), toute étude d'un pathogène doit d'abord viser à préciser son mode de survie ("root inhabiting fungi" ou "soil inhabiting fungi"), ses sites de survie (plantes vivantes, débris de plantes, colonisation

d'habitats inhabituels), les structures intervenant dans sa conservation, enfin, les interactions avec la microflore du sol.

A - Vie saprophyte :

La colonisation ou la non colonisation de fragments de racines stérilisés et placés dans un sol non stérile est le seul critère permettant de définir le comportement saprophytique d'un microorganisme dans le sol (BUTLER 1953, GARRETT 1956, PARK 1959).

I - Matériel et méthodes :

Nous utiliserons trois méthodes différentes, mais qui se complètent pour l'étude des aptitudes saprophytiques du champignon.

1 - Méthode de Cambridge : Inoculum constitué d'un mélange de sable et de mycelium.

2 - Méthode de PARK : Inoculum constitué de fragments de racines liégeuses, colonisés par le champignon.

3 - Inoculum constitué par un disque de gélose provenant d'une culture en boîte de Pétri.

Ces différents inoculums sont mis en présence de fragments de racines liégeuses préalablement stérilisés à l'oxyde d'éthylène pendant une heure à 60° C.

La terre est une terre de serre portant des tomates tous les ans et provenant de St Max (Meurthe et Moselle). Sa stérilisation est effectuée à l'oxyde d'éthylène pendant deux heures à 60° C.

Les milieux de culture utilisés sont :

- Milieu de Czapek-Dox lorsque le champignon est cultivé en milieu liquide.

• Na NO ₃	: 2 g.
• K H ₂ PO ₄	: 1 g.
• K cl	: 0,5 g.
• Mg SO ₄ ,7 H ₂ O	: 0,5 g.
• Fe SO ₄ ,7 H ₂ O	: 0,01 g.
• Saccharose	: 30 g.
• Extrait de levure (B.D. Merieux)	: 2 g.
• H ₂ O _d	: 1 000 ml.

pH final : 5,3 - 5,5.

- Milieu à base de PDA (DIFCO) et d'extrait de levure lorsque les champignons sont maintenus par repiquage successifs en boîte de Pétri ou pour l'étude de leur croissance végétative en tubes.

• PDA	: 20 g.
• gélose	: 10 g.
• Extrait de levure	: 2 g.
• H ₂ O _d	: 1 000 ml.

Nous appellerons ce milieu : milieu (PDA + L).

- Milieu à base de PDA, d'extrait de levure et de chloramphenicol (pour empêcher le développement des bactéries). Ce milieu est utilisé pour mettre en évidence la présence des champignons dans les racines.

• PDA	: 20 g.
• gélose	: 10 g.
• Extrait de levure	: 2 g.

• Chloramphenicol	: 375 mg.
• $H_2 O_d$	: 1 000 ml.

nous appelons ce milieu : milieu (PDA + L + A).

Avant leur ensemencement en milieu gelosé, les racines et les graines de tomates sont toujours stérilisées superficiellement au $Hg\ cl_2$ 1 %.

• $Hg\ cl_2$	: 1 g.
• alcool 95 %	: 500 ml.
• $H_2 O_d$	: 500 ml.

Le temps de stérilisation est de 1 mn pour les fragments de racines et de 30 sec pour les graines de tomate.

1) Méthode de Cambridge (BUTLER 1953) :

a) Principe :

BUTLER (1953), GARRETT (1956) ont montré que l'aptitude de certains champignons à la colonisation saprophytique dépend de leur concentration dans le sol.

Des cultures de P. lycopersici sur sable additionné d'un milieu nutritif sont progressivement diluées avec de la terre, d'une part stérilisée, d'autre part non stérilisée. Nous plaçons des fragments de racines dans des pots contenant le mélange terre - inoculum. L'activité du champignon est mesurée par le nombre de colonies obtenues sur milieu (PDA + L + A) à partir des fragments de racines mortes et retirés périodiquement des pots.

b) Réalisation

- Courbe de croissance :

ooo/ooo

Nous estimons la croissance de notre souche de P. lycopersici sur milieu liquide par détermination du poids sec de la culture.

A partir de cultures de 15 jours sur milieu (PDA + L), nous découpons des disques de 1 cm de diamètre pour inoculer des fioles d'Erlenmeyer de 150 ml contenant 50 ml d'un milieu Czapek-Dox. Les fioles sont placées sur agitateur et maintenues à la température de 26°.

Pour chaque mesure, quatre fioles sont prélevées, et leur contenu recueilli séparément sur creuset muni d'un papier filtre. Le mycelium est lavé à l'eau distillée et son poids sec déterminé. Nous n'avons pas pris en considération le poids des disques de culture puisqu'ils proviennent tous de la même boîte de Pétri.

La Fig (II) montre la courbe de croissance de P. lycopersici dans les conditions décrites.

- Obtention de l'inoculum :

Des cultures maintenues en agitation à 26° pendant 15 jours (ce qui correspond à la croissance maximale du champignon : cf Fig (I)) nous servent à la préparation de l'inoculum.

Le mycelium est séparé du filtrat de culture, broyé dans 50 ml d'une solution de Czapek-Dox stérile à raison d'un Erlenmeyer de culture par tube stérile d'homogénéiseur. Le broyat de mycelium est ensuite réparti dans des fioles de 250 ml renfermant 50 ml de sable et 50 ml d'une solution de Czapek-Dox, préalablement stérilisés, à raison de 12,5 ml par fiole. Les fioles ainsiensemencées sont incubées à 26° à l'étuve pendant 30 jours. Nous procédons à un mélange manuel de l'ensemble toutes les semaines.

POIDS MS
EN G

60

50

40

30

20

10

0

10

20

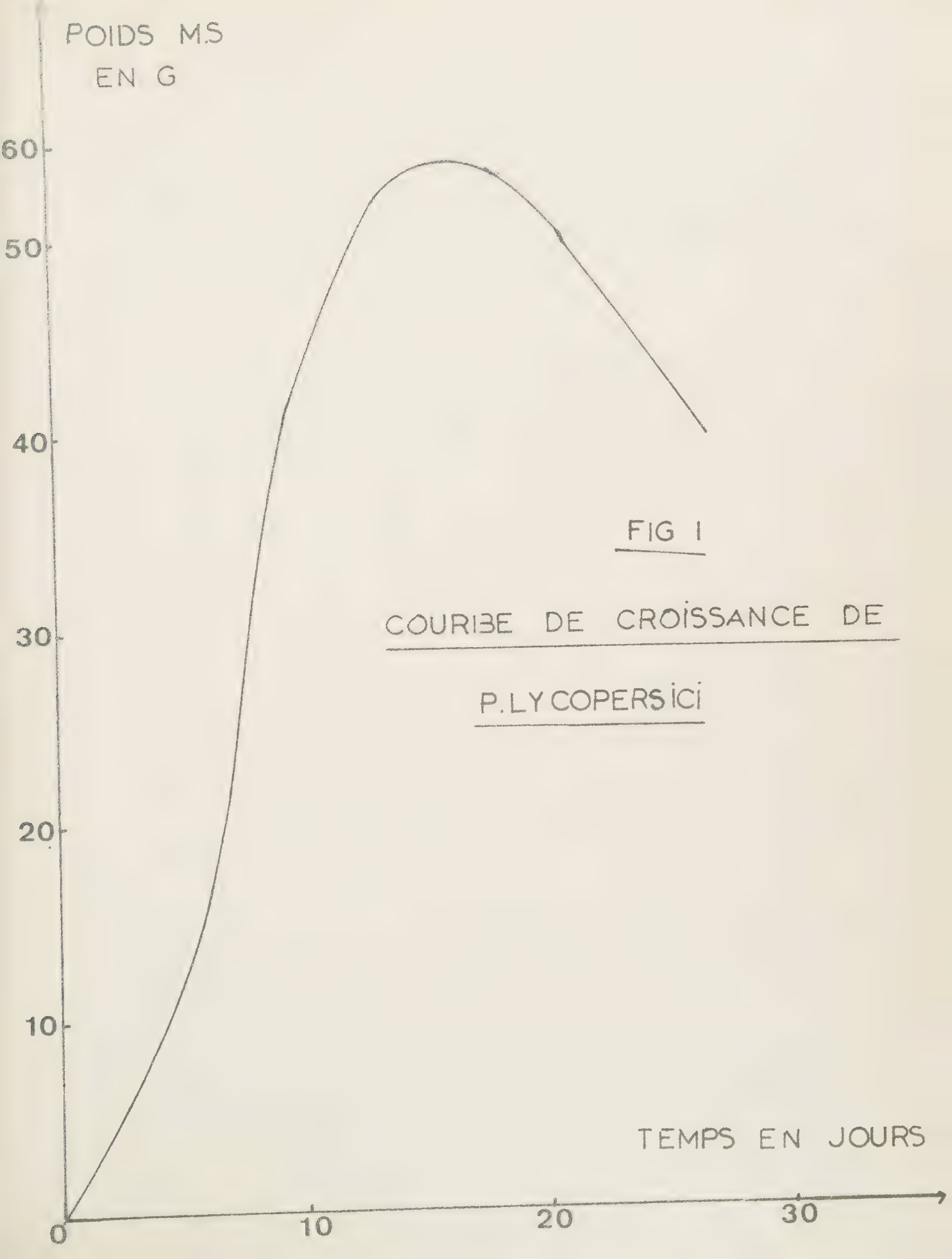
30

FIG 1

COURBE DE CROISSANCE DE

P.LYCOPERSICI

TEMPS EN JOURS



- Dilution de l'inoculum :

L'inoculum ainsi obtenu est mélangé d'une part à de la terre préalablement stérilisée, d'autre part à de la terre non stérile dans les proportions suivantes (volume exprimé en ml).

Dilution Inoculum	Inoculum	Terre	Terre + Inoculum
1	150	0	150
1/2	75	75	150
1/5	30	120	150
1/10	15	135	150

- Taux de contamination des racines :

Lorsque les plantes de tomate sont arrachées, les racines qui persistent dans le sol sont toutes des racines liégeuses. Ainsi utiliserons-nous ces dernières et non pas des racines saines pour l'étude du comportement saprophytique du champignon dans le sol.

Dix fragments de racines liégeuses et stérilisées de tomate de 1 cm de long (variété Montfavet) sont réparties par pot de 150 ml contenant l'inoculum dilué ou non. L'ensemble est placé à l'étuve à 26°.

Toutes les semaines, un pot est prélevé, les racines sont lavées pendant 30 mn à l'eau courante, séchées sur papier filtre, stérilisées superficiellement au $Hg\ Cl_2$, lavées

plusieurs fois à l'eau stérile avant d'être ensemencées sur un milieu (PDA + L + A). Le comptage des colonies est effectué 15 jours après l'ensemencement.

2) Méthode de Park (PARK 1959) :

a) Principe :

La méthode de Cambridge (BUTLER 1953) ne donne des renseignements que sur la possibilité de coloniser des tissus morts. Par contre, la méthode de Park permet d'évaluer la progression du champignon le long du substrat mort.

b) Réalisation :

La terre est tamisée (mailles de 2 mm) puis répartie avec ou sans stérilisation préalable en boîte de Pétri à raison de 50 g par boîte. Nous l'humidifions à 55 % de sa capacité de rétention (GRIFFIN 1966) et nous y plaçons deux inoculums représentés chacun par un fragment de racines de 1 cm de long, préalablement stérilisé et placé pendant 15 jours sur une culture gélosée de P. lycopersici.

Deux pièges constitués par des fragments de 3,5 cm de long provenant de racines liégeuses et stérilisées, sont disposés dans chaque boîte de Pétri de telle sorte qu'une de leurs extrémités soit en contact avec l'un des inoculums, c'est-à-dire qu'au total, nous disposons quatre pièges par boîte. Les extrémités au contact de l'inoculum sont marquées à l'aide d'un fil.

Toutes les semaines, jusqu'à 35 jours, nous prélevons deux boîtes de Pétri, dont les huit pièges recueillis, sont

.../...

découpés chacun en cinq parties numérotées de 1 à 5, 1 étant en contact avec l'inoculum, 5 étant la plus éloignée, puis placés sur

2. Inoculation de la terre gélosée :

a) Principe :

Dans les méthodes de Cambridge et de Park, le substrat est en contact direct avec l'inoculum. La présente méthode teste la possibilité du champignon à parcourir une certaine distance dans le sol avant d'atteindre son substrat.

b) Réalisation :

Comme précédemment, la terre est tamisée puis répartie en boîte de Pétri. Deux disques gélosés d'inoculum sont placés aux extrémités d'un même diamètre, et 4 fragments de 1 cm, préalablement stérilisés, sont disposés autour de chaque disque, deux numérotés 1 et 2 à 1 cm du disque, et les deux autres, 3 et 4, en contact direct par une de leurs extrémités.

Disques d'inoculum et fragments de racines sont légèrement recouverts de terre.

Les fragments sont prélevés comme précédemment toutes les semaines, lavés, stérilisés superficiellement au $Hg\ Cl_2$, puis ensemencés sur un milieu (PDA + L + A).

II - Résultats :

1) Méthode de Cambridge :

Les résultats obtenus par la méthode de Cambridge

figurent dans le tableau I.

% d'inoculum	Nombre de fragments	Temps en jours				
		7	14	21	28	35
Terre stérile + Inoculum	100	10	10	10	10	10
	80	10	10	10	10	10
	60	10	10	10	10	10
	40	10	10	10	10	10
	20	10	10	10	10	10
Terre non stérile + Inoculum	100	10	10	10	10	10
	80	10	10	10	10	10
	60	10	10	10	10	10
	40	10	10	10	10	10

Tableau I :

Colonisation de fragments de racines de Tomate incubés à 26° pendant 7, 14, 21, 28, et 35 jours en présence de terre mélangée à différents taux d'inoculum.

... Terre non stérile ...

Une bonne corrélation existe entre la concentration en inoculum et le nombre de fragments colonisés. Au 7ème, 14ème et 21ème jour, la colonisation des fragments de racines est d'autant plus importante que le taux d'inoculum est plus élevé. Elle atteint son maximum (100 %) en 28 jours même à plus faible concentration.

Des résultats analogues ont été obtenus par BUTLER (1953) pour Fusarium culmorum (W.G.Sm) Sacc., Ophiobolus graminis Sacc., Curvularia ramosa Bainier et par AVIZOHAR et SHAKED (1968) pour Sclerotium rolfsii Sacc.

- Terre non stérile :

La colonisation des fragments de racines par P. lycopersici est nulle. La concentration en inoculum n'a aucune importance sur l'occupation du substrat mort.

2) Méthode de Park :

Les résultats obtenus par cette méthode figurent dans le tableau II.

N° des fragments		Terre stérile					Terre non stérile				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Temps en jours	7	8	6	2	1	0	0	0	0	0	0
	14	8	8	5	3	1	0	0	0	0	0
	21	8	7	8	7	4	0	0	0	0	0
	28	8	8	8	8	8	0	0	0	0	0
	35	8	8	7	8	7	0	0	0	0	0

Tableau II.

Nombre de pièges colonisés par P. lycopersici après incubation à 26° pendant 7, 14, 21, 28 et 35 jours en présence d'un inoculum constitué par 1 fragment de racine de Tomate préalablement colonisé.

- Terre stérile : cf Planche II B.

P. lycopersici a une progression assez rapide le long des fragments de racines préalablement stérilisés. En 7 jours, tous les fragments se trouvant en contact immédiat avec l'inoculum (fragments n° 1) sont colonisés. Un fragment n° 4 sur 8 l'est en 7 jours (distant de $4 \times 0,7 = 2,8$ cm de l'inoculum). Tous les fragments

n°5 ne sont atteints qu'au bout de 28 jours.

A la surface des racines et émergeant de la terre, apparaît un mycelium grisâtre, à croissance luxuriante, poussant dans la terre stérile et de part et d'autre de l'inoculum.

- Terre non stérile :

Les résultats obtenus par cette méthode rejoignent ceux de la méthode précédente. P. lycopersici est incapable d'envahir des substrats morts même lorsqu'il se trouve en contact étroit avec ces derniers.

3) Disques de culture gélosée :

Les résultats obtenus avec cette méthode figurent dans le tableau III.

Terre		Nombre de fragments étudiés	Temps en jours				
			7	14	21	28	35
stérile	A	20	10	16	19	20	19
	B	20	6	16	17	20	20
non stérile	A	20	0	0	0	0	0
	B	20	0	0	0	0	0

Tableau III.

Colonisation de fragments de racines liégeuses de Tomate incubés à 26° pendant 7, 14, 21, 28 et 35 jours à partir d'un disque de culture gélosée.

A : fragment en contact de l'inoculum

B : fragment à 1 cm de l'inoculum.

L'utilisation des disques de culture gélosée comme inoculum donne des résultats qui confirment ceux obtenus avec les méthodes de Cambridge et de Park.

- Terre stérile :

Le champignon parcourt 1 cm en sept jours pour atteindre son substrat. Le taux de colonisation des fragments en

.../...

Terre		Nombre de fragments étudiés	Temps en jours				
			7	14	21	28	35
stérile	A	20	10	16	19	20	19
	B	20	6	16	17	20	20
non stérile	A	20	0	0	0	0	0
	B	20	0	0	0	0	0

Tableau III.

Colonisation de fragments de racines liégeuses de Tomate incubés à 26° pendant 7, 14, 21, 28 et 35 jours à partir d'un disque de culture gélosée.

A : fragment en contact de l'inoculum

B : fragment à 1 cm de l'inoculum.

L'utilisation des disques de culture gélosée comme inoculum donne des résultats qui confirment ceux obtenus avec les méthodes de Cambridge et de Park.

- Terre stérile :

Le champignon parcourt 1 cm en sept jours pour atteindre son substrat. Le taux de colonisation des fragments en

.../...

contact du disque de culture gélosée commence par être important pour s'aligner ensuite avec celui des fragments situés à 1 cm de l'inoculum. Ce dernier est encore reconnaissable à la fin de l'expérience.

- Terre non stérile :

Le disque d'inoculum disparaît au bout du 10ème jour. Ni les fragments en contact ni ceux à proximité de l'inoculum ne révèlent en présence du champignon.

III - Conclusion et discussion :

Des résultats obtenus, nous pouvons retenir les points essentiels suivants :

- Dans nos conditions expérimentales, et en l'absence de la plante hôte, P. lycopersici ne peut pousser dans un sol non stérile. En sol stérile, il est doté d'une grande activité.

- Il ne peut coloniser des tissus morts dans un sol non stérile quel que soit le taux d'inoculum présent dans le sol.

- En sol naturel, la colonisation n'a pas lieu même si le substrat mort est en contact direct avec l'inoculum.

P. lycopersici appartient donc au groupe des "root inhabiting fungi" (GARRETT 1956). Le champignon est dépourvu de toute activité saprophytique.

L'augmentation du taux d'inoculum dans le sol de serre dépend donc uniquement de l'importance de l'attaque de la plante hôte, et non d'une multiplication végétative dans le sol.

Dans la terre non stérile, les fragments de racines sont rapidement colonisés par Fusarium sp., Chaetomium sp., Cephalosporium sp., Colletotrichum coccodés, Cylindrocarpum sp., pour ne citer que ceux que nous avons réussi à isoler et à identifier.

Ces champignons ont une vie saprophytique active. Ils sont capables de coloniser et d'utiliser des substrats morts, même en présence des populations antagonistes. Ils répondent à la définition des "soil inhabiting fungi" donnée par GARRETT (1956).

Parmi les champignons parasites des racines de Tomate qui dominent dans cette colonisation, C. coccodés et F. oxysporum sont les plus importants. Les isolements à partir des racines utilisées dans la méthode de Cambridge nous ont permis de dresser le tableau IV.

Taux d'inoculum		F. oxysporum			C. coccodés		
		1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
Temps en jours	7	52	43	65	36	23	4
	14	86	43	96	6	3	10
	21	76	75	51	3,3	22	8
	28	50	56	73	10	3	6

Tableau IV.

Taux d'infection (en %) des fragments étudiés après 7, 14, 21 et 28 jours, en présence de terre mélangée à différents taux d'inoculum de P. lycopersici.

Nous n'observons aucune relation entre le taux d'inoculum de P. lycopersici et la colonisation des fragments de racines par C. coccodés et F. oxysporum. Nous verrons cependant (cf fig II) que P. lycopersici stimule la croissance végétative de C. coccodés.

F. oxysporum est un colonisateur plus vigoureux des tissus morts que C. coccodés.

HORNBY (1968) a déterminé le taux de colonisation de fragments de racines de Tomate par C. coccodés après 14 et 28 jours. Il conclut que ce champignon a une "aptitude à la colonisation saprophytique très faible". Nos chiffres élevés à 7 jours montrent que C. coccodés a une nette aptitude à la colonisation saprophytique, et qu'à 14 jours et 28 jours, sa mise en évidence semble être entravée par ses associés comme F. oxysporum, c'est ce qui expliquerait les résultats de HORNBY (1968). D'ailleurs, nos résultats confirment ceux de PETHYBRIDGE (1918), M^C KAY (1942), JAKUBZYK (1962).

B- Mode et site de conservation de P. lycopersici :

Les parasites des racines peuvent survivre sous différentes formes et dans des niches écologiques très diverses (PARK 1965).

De tous les caractères de P. lycopersici, ceux qui peuvent orienter nos recherches sont les suivants :

- Le champignon est dépourvu de toute activité saprophytique.
- Le mycelium âgé a des parois épaisses et prend l'aspect de "chlamydospores" en chaîne.
- En culture pure, certaines souches donnent naissance à

.../...

des sclérotés (cf planche V).

- Le mycelium est intracellulaire (cf Planche 1V). Les débris de racine de tomate se décomposent assez rapidement dans le sol (observation personnelle).

A partir de ces données, nous nous proposons d'étudier la survie du parasite dans les débris racinaires de quatre mois retirés du sol, dans les racines conservées dix mois au laboratoire, la survie du mycelium et des sclérotés à l'état libre in vivo et in vitro. Nous discuterons enfin les résultats obtenus.

I - Matériel et méthodes :

1) Survie dans les racines conservées au laboratoire :

Des racines sont lavées abondamment à l'eau courante, séchées puis placées immédiatement dans des sachets en matière plastique à la température ambiante pendant 10 mois.

L'étude est effectuée sur 40 fragments, relavés, stérilisés superficiellement au $Hg\ Cl_2$, puis ensemencés sur milieu (PDA + L + A) à raison de cinq fragments par boîte de Pétri. Le comptage des colonies est effectué 15 jours après l'ensemencement.

2) Survie dans les débris racinaires.

Des échantillons de terre sont prélevés dans une serre de St Max quatre mois après l'arrachage des plantes de tomates. Les gros agrégats sont éliminés par tamisage (mailles de 2 mm). Les débris de racines liégeuses, encore reconnaissables à l'oeil nu, sont recueillis, enfermés dans un sachet de tissus de verre, puis lavés dans un

.../...

bécher de 150 ml surmonté d'un entonnoir sous un filet d'eau pendant 2 heures. Les débris de racines sont ensuite séchés entre deux feuilles de papier filtre, stérilisés superficiellement au $Hg\ Cl_2$ (10 sec), lavés quatre fois à l'eau stérile, puis ensemencés en boîte de Pétri sur milieu (PDA + L + A).

La lecture des boîtes est faite 15 jours après l'ensemencement.

3) Survie du mycelium :

a) Dans le sol :

Nous avons utilisé la méthode décrite par DICKINSON et SHERIDAN (1968).

20 ml d'inoculum obtenu comme précédemment (cf P 22) sont enfermés dans des sachets de tissus de verre (10 x 8 cm). On enterre ces derniers dans des pots de terre non stérile et fraîchement prélevée dans une serre. Toutes les trois semaines et ceci pendant 18 semaines, nous retirons un sachet. Trente fragments d'agréats d'hyphes myceliennes visibles à l'oeil nu sont repiqués sur un milieu (PDA + L). L'examen des boîtes est effectué après une incubation à 26°.

b) In vitro.

Des cultures de P. lycopersici en boîte de Pétri sont conservées au laboratoire pendant 11 mois à la température de 26°. Pour prélever le mycelium, nous rehydratons la gélose avec 1 ml d'eau distillée stérile par boîte de Pétri. Trente carrés de mycelium (2 x 2 mm) sont découpés à la périphérie des colonies, puis ensemencés en boîte de Pétri sur milieu (PDA + L).

4) Survie des sclérotés :

Comme précédemment, nous rehydratons les cultures desséchées de P. lycopersici ayant développé des sclérotés. Ceux-ci sont recueillis à l'aide d'un scalpel sous la loupe binoculaire, puis ensemencés en boîte de Pétri sur milieu (PDA + L).

II - Résultats :

1) Survie dans les racines conservées au laboratoire :

L'ensemencement des fragments de racines en boîte de Pétri donne les résultats figurant dans le tableau V.

Racines	colonies : en %	Survie en %
Fraîches	86	100
Conservées 10 mois au laboratoire	73	84

Tableau V.

% de fragments de racines conservés 10 mois au laboratoire ayant donné des colonies de P. lycopersici après incubation de 15 jours à la température de 26°. milieu (PDA + L + A).

Le nombre des colonies de P. lycopersici issu des racines de plantes fraîchement arrachées et de racines conservées dix mois au laboratoire est pratiquement identique. Les racines mortes semblent donc offrir un site privilégié pour la conservation du

.../...

champignon.

2) Survie dans les débris de racines retirés du sol :

P. lycopersici est facilement isolé à partir de débris de racines reconnaissables à l'oeil nu et ayant séjourné 4 mois après l'arrachage des plantes dans le sol. Les résultats des isolements figurent dans le tableau VI.

nombre de débris de racines ensemencés	nb de débris portant <u>P. lycopersici</u>
50	7

Tableau VI.

Des formes semblables au mycelium de P. lycopersici ont été souvent isolées à partir de racines en décomposition par HORNBY (1968).

La fréquence d'isolement obtenue (14 %) est nettement inférieure à celle obtenue avec les racines conservées au laboratoire. Le séjour des racines dans le sol s'accompagne donc d'une réduction de la survie du champignon. PARK (1965) a montré que dans le sol, il y a un déclin naturel de la viabilité des structures de conservation.

Cependant, ce chiffre de 14 % est peut-être plus faible que la réalité, car la présence d'une microflore active dans les débris racinaires pourrait gêner la mise en évidence du pathogène.

3) Survie du mycelium.

a) Dans le sol :

Le prélèvement et l'ensemencement périodique des agrégats myceliens en contact avec la terre non stérile permettent de dresser le tableau VII.

Temps en semaines	0	3	6	9	12	15	18
Survie en %	100	96	80	70	66	68	52

Tableau VII.

Dans nos conditions expérimentales, après 18 semaines d'incubation en terre non stérile, 52 % des agrégats d'hyphes testés restent viables. P. lycopersici est donc capable de survivre à l'état libre dans le sol.

b) En culture pure :

Comme dans les racines desséchées, le mycelium résiste à la dessiccation en culture pure (Tableau VIII).

Temps en jours	0	300
Survie en %	100	57

Tableau VIII

L'arrêt de la croissance mycelienne semble ne pas entraîner la perte de viabilité.

4) Survie des sclérotés.

Nous avons entrepris cette étude quoique nous ne croyons pas en leur présence dans les tissus vivants de l'hôte ou dans les débris racinaires.

Le taux de survie des sclérotés obtenus en culture pure figure dans le tableau IX.

Temps en jours	20	300
Survie en %	100	66

Tableau IX.

En culture pure, la perte de viabilité des sclérotés est légèrement inférieure à celle du mycelium (cf tableau VIII).

III - Conclusion et discussion :

De cette étude sur les modes et sites de survie de P. lycopersici, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Les racines de Tomate offrent un site privilégié pour la conservation de P. lycopersici, car sa survie d'une part est nettement supérieure dans les racines conservées au laboratoire (84 %) qu'en culture pure (52 %), d'autre part, identique dans les racines fraîchement arrachées et dans les racines après une conservation de 10 mois (cf tableau V).

- Le champignon est facilement isolé à partir des débris

de racines ayant séjourné 4 mois dans le sol après la récolte. Le temps séparant l'arrachage et le repiquage des plantes de tomate est de 5 à 6 mois. Nous n'avons pas analysé les débris de six mois, car à cet âge, ils ne sont pas reconnaissables à l'oeil nu.

Les débris végétaux ont généralement un rôle primordial dans la survie de certains pathogènes. La conservation d'Helminthosporium sativum dans les chaumes d'orge, de Cercospora herpotrichoides dans les pailles de blé, de Fusarium sp dans différents tissus a été démontrée respectivement par ANWAR (1949), MACER (1961), NYVALL et KOMMEDAHL (1968). Beaucoup d'autres exemples peuvent être cités.

WHITE (1945) a montré que Formes annuelles survit assez longtemps dans les racines grâce à la barrière protectrice qu'est l'écorce.

Nous savons que la lignine et la subérine sont deux des matériaux les plus résistants à la dégradation, et qu'ils se décomposent très lentement dans le sol (WOOD 1960). Or, ces substances sont deux des constituants de la paroi des cellules liégeuses (cf Planche IV). Nous pensons donc que tant que les cellules des tissus racinaires ne sont pas détruites, les parois subérifiées continuent à fonctionner comme une barrière sélective en empêchant l'entrée des champignons incapables de les traverser. Le parasite se trouve ainsi protégé de l'action d'une certaine microflore antagoniste du sol.

D'après LOCKWOOD (1959), la survie d'un champignon dans le sol dépend davantage de la présence de sclérotés, ou oospores, chlamydospores que du mycelium. Certains pathogènes en effet, comme Fusarium oxysporum (STOVER 1958, MESSIAEN et coll 1965) Sclerotium rolfsii (SCOTT 1956) sont incapables de survivre dans le sol sous forme mycelienne.

PADY et KRAMER (1960), NYVALL et KOMMEDAHL (1968) démontrent que les formes myceliennes à paroi épaisse peuvent persister dans le sol pendant de longues périodes. Or, le mycelium âgé de P. lycopersici se présente sous forme d'un enchaînement d'articles à paroi épaisse, mycelium que nous pouvons facilement mettre en évidence dans les cellules des tissus attaqués (cf Planche IV), et au centre des colonies en culture pure, c'est-à-dire là où le milieu s'est épuisé. C'est donc une forme d'adaptation aux conditions défavorables au même titre que sclérotés et chlamydospores.

Après décomposition totale des racines, le champignon peut se conserver dans le sol à l'état libre avec une perte de viabilité de 48 % en quatre mois. Près de la moitié de l'inoculum initial pourrait donc être encore viable au moment du repiquage des jeunes plantes de Tomate.

Nous avons isolé le champignon à partir des racines, mais nous n'avons pu le faire directement à partir du sol, peut-être à cause des phénomènes de compétition qui empêcheraient sa manifestation, ou encore en raison de sa présence en quantité non détectable par la méthode d'isolement utilisée (Méthode de dilution). Il faudrait alors trouver une méthode de piégeage ou d'enrichissement.

PUGH (1958), CALDWELL (1963) ont montré que la décomposition des racines dans le sol est accompagnée par un changement tant dans l'identité des champignons que dans leurs proportions relatives. Il semble donc que cette succession affecte peu la survie de P. lycopersici puisque près de la moitié de l'inoculum à l'état libre (cf Tableau VII) peut rester viable entre deux cultures. Cette situation du parasite dans le sol implique une plus ou moins grande tolérance à l'égard de la population antagoniste et s'expliquerait par la latence des formes myceliennes de conservation.

.../...

Nous allons donc étudier l'action directe de différents champignons isolés de la rhizosphère sur la croissance végétative de P. lycopersici.

C- Interaction de P. lycopersici avec certains microorganismes du sol

La production de certaines substances chimiques par les microorganismes semble être l'un des facteurs entraînant la réduction de la survie des parasites dans le sol (GARRETT 1956, PARK 1965).

L'étude des interactions à distance entre deux microorganismes peut donc nous donner une idée sur le comportement de l'un vis à vis de l'autre.

De nombreuses études ont été faites en confrontant directement en boîte de Pétri deux (ou plusieurs) microorganismes (TVEIT 1965, NAIM et HUSSEIN 1966, CHANG et KOMMEDAHL 1968). Il est certain que par une telle méthode, les facteurs existant dans la rhizosphère sont supprimés, que les taux d'inoculum propres à chaque espèce ne sont pas respectés et que la résultante des interactions avec la population saprophyte du sol ne peut être réduite à une somme. Cette étude a cependant pour objet essentiel de connaître les interactions directes entre les champignons choisis et P. lycopersici, l'influence des métabolites susceptibles d'être élaborés dans le substrat (ou volatils) sur le développement de ce parasite.

I - Matériel et méthodes :

1) Principe :

Lorsqu'un champignon est placé sur un substrat uniforme, en l'absence de tout phénomène inhibiteur ou stimulateur, le rapport

.../...

des rayons internes et externes des colonies est égal à 1 (JOUAN et coll 1964).

La mesure des rayons de deux colonies, avant leur contact, peut donc nous donner une appréciation des interactions possibles.

2) Réalisation :

Dans cette étude des interactions entre P. lycopersici et certains microorganismes du sol, nous mettons en confrontation le parasite et à titre comparatif C. coccodés avec les champignons les plus fréquemment isolés de la rhizosphère et du rhizoplan de la tomate : C. coccodés, F. oxysporum, Alternaria sp, Chaetomium sp.

Les différentes confrontations sont réalisées à l'aide de disques calibrés ($\emptyset = 0,5$ cm) provenant d'une culture de 15 jours pour P. lycopersici et de 10 jours pour les autres champignons. Les disques sont déposés en boîte de Pétri sur un milieu (PDA + L). Entre les disques, des distances constantes sont respectées : à 4 cm l'un de l'autre et à 2,5 cm du bord de la boîte.

Cinq boîtes sont utilisées pour chaque confrontation.

P. lycopersici estensemencé 4 jours avant les autres champignons à cause de sa très faible vitesse de croissance (cf tableau XI).

II - Résultats :

Bien que les champignons choisis ne manifestent que de très faibles interactions, les techniques biométriques utilisées ont permis de faire ressortir un certain nombre de faits intéressants concernant leur action réciproque à distance.

Pour faciliter la compréhension, les résultats sont rassemblés dans la Fig (II) sous forme d'histogrammes représentant la mesure des rayons internes et externes des colonies de C. coccodés d'une part, et de P. lycopersici d'autre part, soumis à l'action des quatre autres champignons et d'eux-mêmes.

Les histogrammes dont l'extrémité n'est pas comprise dans la zone grisée, représentant la plus petite différence significative entre la mesure des rayons des colonies de C. coccodés ou de P. lycopersici confrontés à eux-mêmes (2 colonies par boîte), traduisent une action significative du traitement envisagé sur le champignon considéré.

L'histogramme O représente le rayon (interne ou externe) de P. lycopersici ou de C. coccodés poussant dans les boîtes de Pétri, mais à raison d'une colonie par boîte, c'est à dire qu'ils ne sont confrontés ni à eux-mêmes ni à aucun autre champignon.

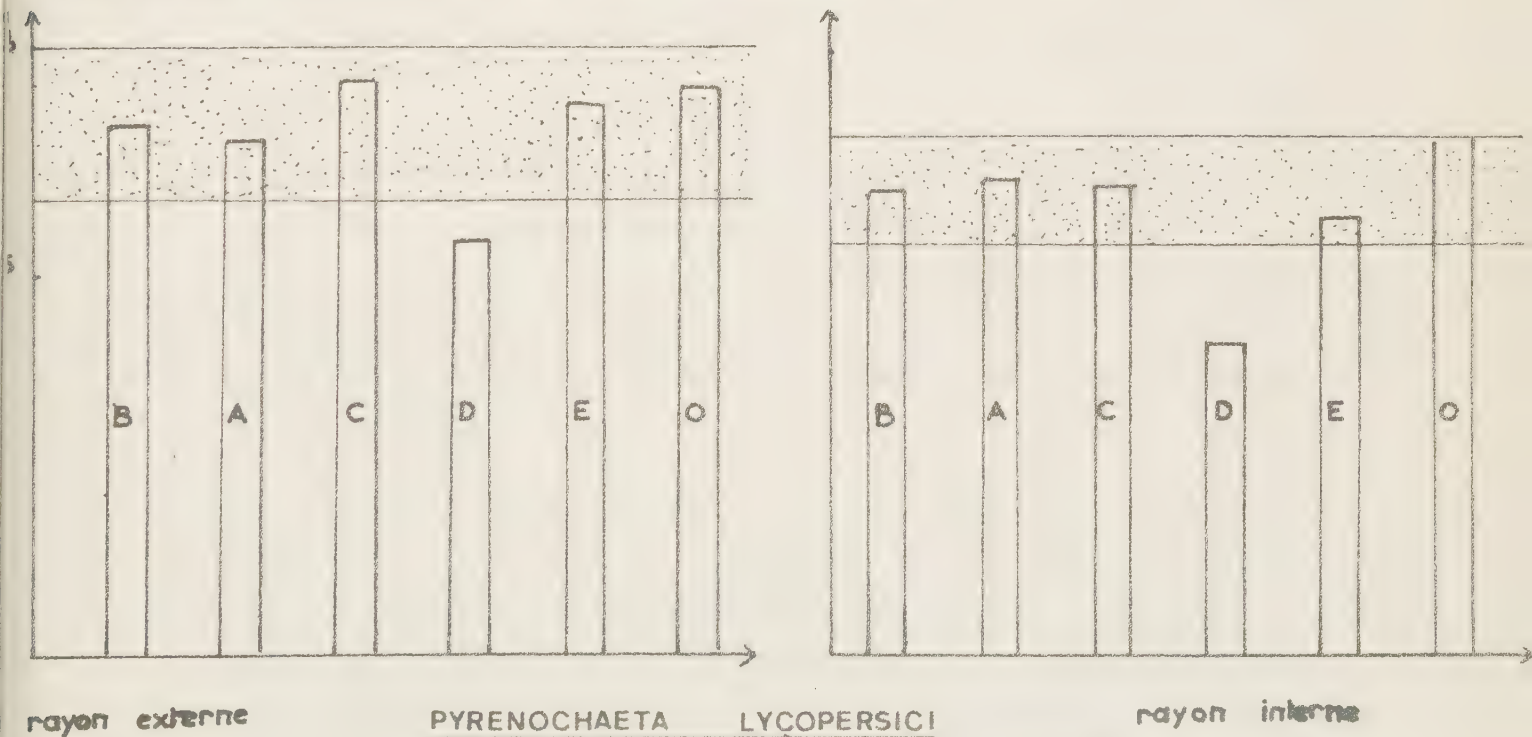
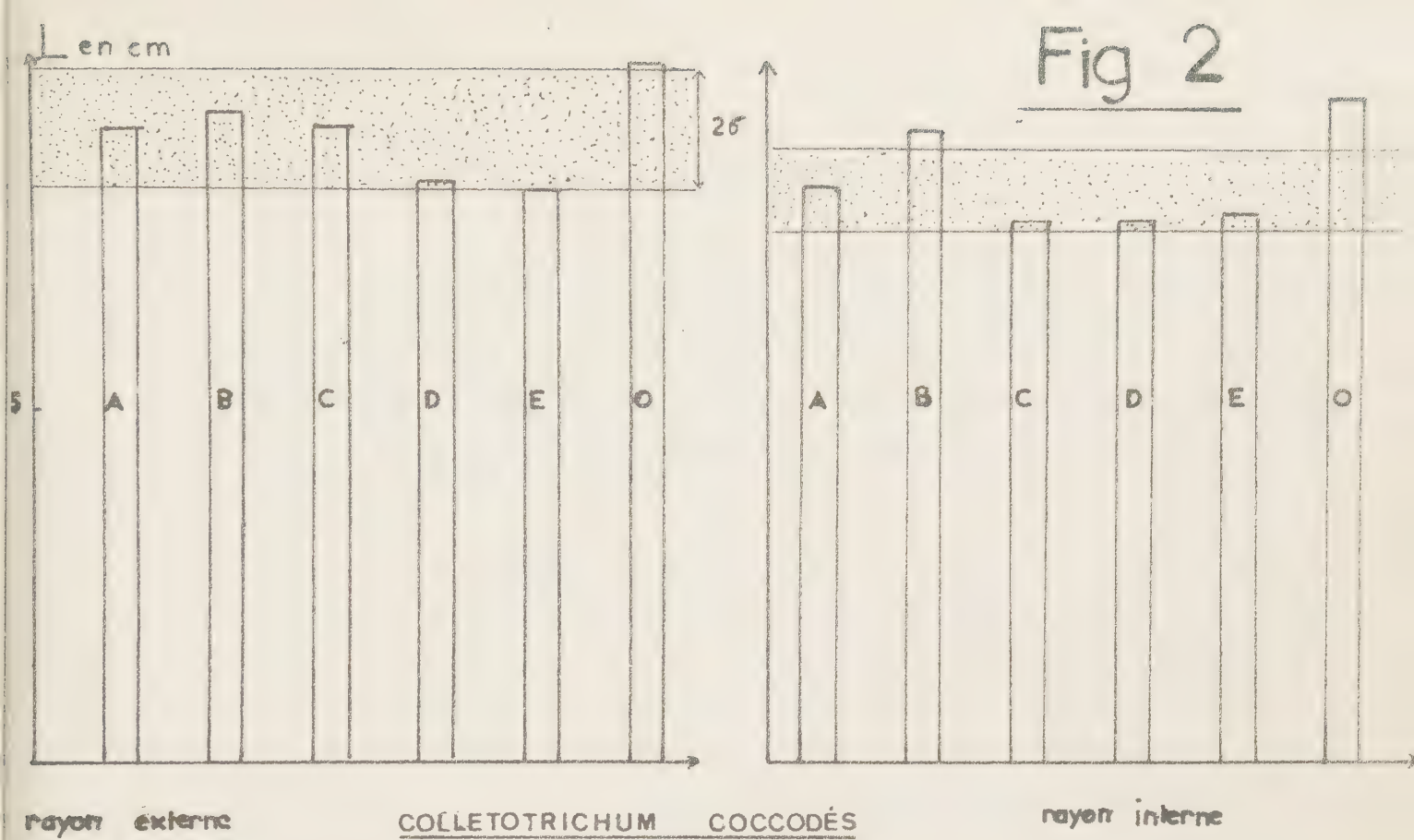
- P. lycopersici : Sur les quatre champignons étudiés, seul F. oxysporum a un effet dépressif sur les rayons internes et externes des colonies. L'effet se faisant davantage sentir sur les rayons internes.

- C. coccodés : Il est à noter que P. lycopersici a une action stimulante sur la croissance de C. coccodés. Un examen visuel des boîtes de Pétri permet de constater que les colonies de P. lycopersici inhibent partiellement ou totalement la production de sclérotés par C. coccodés. Les colonies de ce dernier champignon en confrontation avec Chaetomium sp par exemple ne sont pas modifiées.

L'étude des courbes de contact définies par la rencontre de deux colonies fongiques ne nous a rien révélé de particulier.

.../...

Fig 2



A : C. COCCODES
 B : P. LYCOPERSICI
 C : CHAETOMIUM sp
 D : F. OXYSPORUM
 E : ALTERNARIA sp
 O : A ou B seul

HISTOGRAMMES DES RAYONS
 EXTERNES ET INTERNES DE
 A ET DE B MIS EN PRESENCE
 DE A, B, C, D, E

III - Conclusion et discussion :

L'action stimulante de P. lycopersici sur C. coccodés est due à la production de métabolites élaborés dans le substrat **puis-** que cette action se fait à distance. La nature exacte de ces métabolites nous est inconnue, peut-être s'agit-il par exemple de vitamines comme dans le cas de Phytophthora cryptogea et de certaines bactéries (ERWIN et KATZNELSON 1961).

TRUSKOWSKA et NARKIEWICZJODKO (1969) ont récemment étudié l'action de certains saprophytes sur C. coccodés et d'autres parasites de racines de Tomate. Ils ont démontré que l'action des métabolites de ces saprophytes se caractérise par une action double : inhibitrice dans le cas d'une concentration élevée, stimulante à plus faible concentration. Nous pouvons supposer que P. lycopersici secrète une substance en quantité suffisante pour stimuler la croissance végétative de C. coccodés et inhiber la formation des sclérotés.

Les produits du métabolisme de F. oxysporum inhibent la croissance végétative de P. lycopersici. Une modification du milieu de culture où une production de substances nuisibles par exemple peuvent en être la cause. COOK et coll(1947) ont en effet montré que F. oxysporum secrète une substance antibiotique, substance qui est peut-être responsable de l'inhibition in vitro de la croissance de P. lycopersici.

D'après GARRETT (1956), la production d'antibiotiques et la tolérance aux antibiotiques produits par les autres microorganismes sont deux des caractéristiques définissant les champignons ayant une aptitude à la colonisation saprophytique. P. lycopersici, "root inhabiting fungus", semble ne pas tolérer l'action de certains microorganismes du sol comme F. oxysporum, ce qui expliquerait la diminution enregistrée dans sa survie (cf tableau VII). Par contre,

C. coccodés, colonisateur actif des tissus morts (cf tableau IV) semble n'être gêné dans sa croissance par aucun des champignons testés.

Cette action anticiotique de la microflore antagoniste pourrait donc expliquer l'inactivité du champignon dans le sol en l'absence de son hôte. Il nous est très difficile cependant de préciser s'il se trouve à l'état dormant (inactivité inhérente) ou à l'état latent (inactivité imposée par un environnement défavorable) quoique nous l'ayons isolé à partir de cultures intermédiaires comme le melon et la laitue. Son état de dormance pourrait en effet être rompu par la présence d'un de ces hôtes. Aussi, ne ferons-nous aucune distinction entre état de latence et état de dormance et nous dirons qu'il est en état de vie ralentie.

Nous savons que la production de ces substances inhibitrices peut être l'une des sources des propriétés fongistasiques du sol (LOCKWOOD 1964, JACKSON 1965). Les structures de conservation, sous l'effet de la fongistase restent dormantes dans le sol jusqu'au déclenchement de la germination, stimulée par les racines de la plante hôte (SCHROTH et HILDEBRAND 1964). Il serait donc intéressant d'étudier ces phénomènes de fongistase, car si nous arrivons à faire germer le parasite et à l'éliminer en l'absence de la plante hôte, nous aurons un moyen de lutte efficace comme cela s'est produit pour d'autres pathogènes (CHINN et coll 1953, PAPAIVIZAS 1968).

Des quatre champignons étudiés, seul F. oxysporum a une action antagoniste à l'égard de F. lycopersici. Mais F. oxysporum est un parasite des racines, aussi son emploi en tant qu'agent de lutte biologique ne peut être envisagé. Une étude approfondie des saprophytes vivant dans la rhizosphère de la tomate (Aspergillus sp, Penicillium sp, Trichoderma sp et d'autres) pourrait révéler un ou plusieurs

champignons puissamment antagonistes et pouvant inhiber le développement de P. lycopersici.

Le comportement de P. lycopersici dans le sol pose un problème. En effet, nous pouvons nous demander comment un champignon incapable de pousser dans le sol, sensible à l'action de la microflore antagoniste du sol peut pénétrer, infecter et coloniser la plante hôte. C'est ce problème que nous nous proposons d'étudier dans le prochain chapitre.

CHAPITRE II

L'INFECTION DES RACINES

=====

Après avoir étudié la survie de Pyrenochaeta lycopersici dans le sol, nous consacrerons ce deuxième chapitre à l'étude de l'infection du système racinaire. Nous nous intéresserons plus particulièrement au mode d'infection des racines, à la progression du parasite dans ces dernières, à l'étude anatomique des lésions, à la succession de P. lycopersici, C. coccodés et F. oxysporum sur les racines de Tomate, enfin, à la sensibilité variétale.

A- Contamination des racines:

PARKINSON et PEARSON (1967) ont montré que les exsudats racinaires sont la principale cause d'entrée en activité des champignons noirs et stériles de la rhizosphère. Quand la stimulation de la germination des organes de conservation est achevée, l'infection peut avoir lieu si toutes les conditions nécessaires au développement initial du pathogène sont remplies (GAUMANN 1950, SADASIVAN et SUBRAMANIAN 1960). Or, si le champignon est incapable de pousser dans un sol en l'absence de son hôte, le peut-il en sa présence ? est-il capable de parcourir une certaine distance dans le sol avant de contaminer son hôte ? C'est ce que nous allons essayer d'éclaircir.

I - Matériel et méthodes :

Des terrines de 15 x 13 x 10 cm sont divisées en deux compartiments à l'aide d'un grillage en acier inoxydable à mailles

.../...

très fines ($\varnothing = 100 \mu$) afin d'empêcher le passage des racines et permettre celui du mycelium. Un compartiment est rempli de terre stérilisée et additionnée d'inoculum, l'autre uniquement de terre stérilisée.

Deux plantules de trois semaines, obtenues à partir de semences (variété St Pierre) mises à germer au préalable dans des mottes de terreau de $3,5 \times 3,5 \times 5$ cm, sont repiquées par terrine dans le compartiment stérile. Nous utilisons cinq terrines au total.

La salle de culture est éclairée par 39 lampes (40 W) de 1,20 m chacune, type lumière du jour. L'éclairement varie de 5 500 à 9 600 lux suivant la position des lampes. Le temps d'éclairage quotidien est fixé à dix heures. La température de la salle varie entre 20 et 25 °C.

La croissance en hauteur des tiges est facilitée par des supports de ficelles. La distance entre les extrémités des tiges et les lampes est respectée en faisant varier la hauteur des supports des pots.

Les plantes sont arrosées tous les deux jours à l'eau courante et une fois par semaine avec une solution nutritive de Hoagland.

L'observation des systèmes racinaires est effectuée quatre mois plus tard après l'arrachage des plantes.

II - Résultats :

La technique employée empêche le contact entre les organes de conservation et les racines.

Après arrachage et lavage des plantes de tomate, le système racinaire ne révèle aucun symptôme d'attaque.

Donc, malgré la proximité des racines, donc des exsudats racinaires, l'infection ne peut avoir lieu qu'après contact entre le parasite et son hôte.

III - Conclusion et discussion :

TERMOHLEN (1962), LAST et coll (1968) ont montré que le pourcentage de racines atteintes de BRR augmente avec le taux d'inoculum dans le sol. Lorsque ce taux est important, la manifestation des symptômes est généralisée. Nous pensons que cette généralisation est due à la multiplicité des points de contact entre les racines et le parasite.

Des cas de généralisation des symptômes par multiplicité des points d'attaque ont été observés pour d'autres maladies et particulièrement celles des "leaf spot".

Cependant, nous pouvons nous demander si cette généralisation des symptômes n'est pas due à une progression du parasite dans les racines. Cette question nous conduit donc à étudier la vitesse de progression de P. lycopersici dans les tissus racinaires de tomate.

B- Progression dans les racines:

Lorsque nous observons le système racinaire de plantes de tomates âgées de deux à trois mois (cf Planche I), nous constatons que ce dernier est divisé en deux zones distinctes.

- Une zone de racines centrales saines dans la motte de terreau.
- Une zone de racines nécrosées à l'extérieur de la motte.

ooo/ooo

Trois hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette nette séparation :

- P. lycopersici ne peut entrer en compétition avec la population de microorganismes vivant dans la motte de terre car l'hypothèse n'est pas valable puisque le champignon ne peut s'étendre dans la terre non stérile, donc dans la motte.

- Il existe dans la motte des produits toxiques pour le champignon. Ces produits toxiques ne disparaissent qu'après la décomposition de la motte. Cette hypothèse est peu probable puisque, si P. lycopersici envahissait le système racinaire, ce serait par l'intérieur des racines, donc à l'abri des substances toxiques.

- P. lycopersici a une croissance si lente qu'il ne peut atteindre la partie centrale du système racinaire.

C'est cette dernière hypothèse que nous allons vérifier en étudiant l'effet d'un même taux d'inoculum différemment distribué dans les pots de culture, sur une variété de tomate sensible (Montfavet).

I - Matériel et Méthodes :

Comme précédemment, des graines de tomate (variété Montfavet) sont mises à germer dans les mottes de terreau de 3,5 x 3,5 x 5 cm. Les jeunes plantes de trois semaines sont ensuite repiquées avec leur motte dans des pots contenant de la terre infestée (Terre A : 3 volumes de terre stérile + 1 volume inoculum) et non infestée (Terre B : 3 volumes de terre stérile + 1 volume de sable). La terre A et la terre B sont seules, en mélange, ou superposées.

Nous procédons à cinq traitements à raison de cinq plantes par traitement. La méthode utilisée est celle décrite par LAST et EBBEN (1966).

.../...

- Traitement n° 1 : 12 cm terre A.
- Traitement n° 2 : 12 cm terre B.
- Traitement n° 3 : 6 cm terre A + 6 cm terre B. La terre A recouvrant la terre B.
- Traitement n° 4 : 6 cm terre B + 6 cm terre A. La terre B recouvrant la terre A.
- Traitement n° 5 : 6 cm terre A + 6 cm terre B. La terre A et la terre B sont en mélange.

Comme nous escomptons évaluer la progression du parasite en cm, nous n'avons pas tenu compte du volume de terre (les pots n'étant pas cylindriques) mais de la hauteur.

La conduite de l'expérience a été déjà décrite (cf P 49).

L'examen des systèmes racinaires est effectué après quatre mois de culture.

II - Résultats : cf Planche III.

A quatre mois, l'examen des systèmes racinaires des différentes plantes de tomate montre une différence significative entre les divers traitements.

- Traitement n° 2 (terre infestée) : Le système racinaire est sain.
- Traitement N° 3 (Inoculum à la partie supérieure du pot) : l'attaque est limitée uniquement à la partie supérieure.

- Traitement n° 4 (Inoculum au fond du pot) : La partie supérieure du système racinaire est saine.

- Traitements n° 1 et n° 5 (terre infestée) : Dans ces deux traitements, les systèmes racinaires montrent des symptômes identiques. La dilution de l'inoculum dans le traitement n° 5 n'a pas été suffisante pour diminuer l'importance de l'attaque.

III - Conclusion et discussion :

Nos observations permettent de confirmer les résultats de LAST et EBBEN (1966) et d'interpréter certaines pratiques culturales de lutte courantes.

Nous n'avons pas pu mesurer avec précision la progression du champignon à l'intérieur des tissus racinaires, mais nous avons pu constater que :

- Quelle que soit la distribution de l'inoculum (traitements n° 3 et n° 4), l'attaque du système racinaire est bien limitée à la terre infestée du pot.

- La progression est cependant légèrement plus rapide lorsque l'inoculum se trouve dans la partie supérieure du pot (traitement n° 3) que lorsqu'il se trouve dans la partie inférieure (traitement n° 4). LAST et EBBEN (1966) pensent que ce phénomène est dû à un lessivage des organes de conservation par l'eau d'arrosage.

Ces résultats confirment notre troisième hypothèse à savoir que c'est la très faible progression du parasite qui sauvegarde, au moins pour un certain temps, la partie centrale du système racinaire. La généralisation des symptômes est donc due uniquement à la multiplicité des points d'attaque.

L'augmentation du volume de la motte de terreau a pour effet de préserver une partie du système racinaire de l'infection (LAST et EBBEN 1966) en constituant un manchon protecteur. Les racines sont attaquées uniquement à leur émergence de la motte. La séparation zone saine-zone attaquée devient moins apparente avec l'avancement de la saison et la décomposition de la motte protectrice à la fin de la période végétative.

Notre protocole expérimental (traitement 1) reproduit exactement la stérilisation superficielle du sol par le feu. La couche profonde du pot est infestée. Une stérilisation superficielle permettrait donc de retarder l'attaque de la partie supérieure du système racinaire, donc les risques de dégâts. EBBEN et WILLIAMS (1956) ont en effet établi une relation entre la gravité de la maladie et l'importance des lésions pendant les trois premiers mois de végétation.

C- Etude anatomique des lésions :

Des observations microscopiques de coupes de racines de Tomate infectées par P. lycopersici ont été effectuées par TERMOHLEN (1962), PREECE (1964). JOHNSON (1939) a décrit des symptômes analogues pour le BRR du tabac sans pouvoir lui associer un agent pathogène.

Cependant, ces différents auteurs n'ont donné qu'une description sommaire de l'aspect histologique de la maladie. Ils n'ont envisagé aucune interprétation des différents symptômes observés, aucune étude sur les modifications secondaires de la paroi des cellules attaquées.

I - Matériel et Méthodes

L'examen des tissus attaqués est effectué à l'aide de coupes fines, faites à main levée, sur des racines de 90 jours.

présentant des symptômes de liège et de BRR, et ayant séjourné pendant 15 jours dans du picroformol de Bouin (LANGERON 1949) pour durcir les tissus.

1) Mise en évidence du mycélium dans la racine :

Le colorant utilisé est le bleu de bromophénol mercurique (BB Hg) : 10 g Hg Cl_2 ; 0,1 g de bleu de bromophénol, 100 ml alcool 95 %. Ce colorant a le pouvoir de colorer en bleu les structures protéiques. La coloration est d'autant plus intense que la structure est plus riche en protéines. De plus, le BB Hg pourrait jouer aussi le rôle de fixateur.

Les coupes sont immergées 10 à 15 mn dans le colorant. Elles sont ensuite lavées pendant 20 mn dans une solution d'acide acétique à 0,5 % pour enlever l'excès de colorant, puis à l'eau de robinet.

Les coupes sont examinées dans de la glycérine.

Le mycelium intracellulaire apparaît coloré en bleu.

2) Mise en évidence du suber :

Le suber se colore en rouge par le soudan III.

Nous préparons une solution saturée à chaud dans l'alcool 70 %. Nous colorons les coupes pendant 10 mn après un passage préalable à l'alcool 50 %. Les coupes sont ensuite relavées à l'alcool 70 % puis examinées dans de la glycérine.

3) Mise en évidence de la lignine :

Pour la détermination qualitative de la lignine, nous utili-

sons deux réactifs : le réactif de Maïlle et la phloroglucine - Hcl.

a) Réactif de Maïlle.

Le réactif de Maïlle est le colorant le plus caractéristique de la lignine. Les coupes sont traitées pendant 5 mn par $KMNO_4$ à 1 %. Elles sont ensuite lavées à l'eau, puis décolorées par Hcl étendu au moitié. Après lavage à l'eau, elles sont traitées au NH_4OH puis montées dans la glycérine.

La lignine prend une coloration rouge.

b) Phloroglucine - Hcl :

En présence de phloroglucine, le bois prend une coloration pourpre intense. Nous plaçons les coupes dans une solution alcoolique de phloroglucine à 2 %, puis d'acide chlorhydrique 50 %. Les observations au microscope sont faites après montage à la glycérine.

II - Résultats : cf Planche IV.

1) Observations générales :

En coupe transversale, une des caractéristiques la plus frappante des lésions causées par P. lycopersici est la démarcation nette entre les zones saines et les zones attaquées. La maladie s'étend plus ou moins au Cortex, le cylindre central reste intact. Dans le cas de jeunes racines, l'attaque du Cortex est générale, tandis que pour les racines plus âgées, elle est limitée à des couches externes de cellules dont nous n'avons pas pu déterminer le nombre exact.

.../...

L'écorce des racines âgées et attaquées est parcourue par de profondes crevasses.

Les cellules infectées présentent un épaissement de la paroi cellulaire qui devient deux à trois fois plus importante que dans une cellule saine. Certaines cellules ont un contenu altéré, granuleux représentant peut-être un des premiers stades de l'attaque comme l'ont observé pour d'autres maladies DUFRENOY (1936), JOH (1939).

2) Extension de la maladie-symptômes :

D'après ces observations générales, nous pouvons proposer une explication sur l'extension de la maladie et la manifestation des symptômes.

L'extension des lésions se fait à partir des nécroses superficielles. Elle est lente (cf P 53) et se fait dans tous les sens.

Le mycelium passe d'une cellule à l'autre avec formation d'appressoria. La pénétration d'une cellule est associée avec le brunissement de son contenu. La paroi s'épaissit de plus en plus, et s'incruste de substances diverses. L'évolution des symptômes est alors différente suivant qu'il s'agisse de racines jeunes ou de racines âgées.

- Racines jeunes :

Les lésions s'étendent radialement à travers le Cortex jusqu'à l'endoderme. Le cylindre central arrêtant cette extension radiale, se trouve peu à peu ceinturé par des cellules attaquées. Il se produit alors une extension longitudinale entre la stèle et le

Cortex. Cette extension longitudinale entraîne la décortication des jeunes racines et donne ainsi l'un des symptômes les plus caractéristiques de la maladie.

- Racines âgées :

Le champignon n'atteint pas l'endoderme. Il se limite aux couches de cellules superficielles qui se subérissent et donnent ainsi à la racine son aspect liégeux.

Comme les racines continuent à augmenter de diamètre, les couches superficielles de cellules liégeuses devenues rigides, sont poussées vers l'extérieur. Il se produit un craquellement donnant naissance à des crevasses plus ou moins profondes. Parfois, ces crevasses sont si profondes qu'elles atteignent les parties saines du Cortex.

3) Identifications histochimiques :

a) Identification du suber.

Seules les parois des cellules liégeuses sont colorées en rouge par le soudan III. Le reste des cellules (cellules saines du Cortex, phloème, bois) est blanc grisâtre. La subérisation des parois paraît continue.

b) Identification de la lignine :

D'après SUZUKI (1957), la coloration rouge des parois cellulaires traitées par la phloroglucine -Hcl est due principalement à la lignine quoique l'acide caféique et l'acide galacturonique

puissent donner la même réaction. Par contre, le réactif de Maule est caractéristique de la "lignine" (LANGERON 1949).

Seules les cellules attaquées des couches superficielles du Cortex réagissent positivement aux deux colorants. La lignine se dépose uniquement en certains points des parois des cellules infectées.

La lignine ne peut être mise en évidence qu'après dissolution des pigments déposés sur la paroi cellulaire, par l'Hcl 50 % présent dans le réactif de Maule et la phloroglucine-Hcl. Des colorants comme le $Zn\ Cl_2 - I_2$, le vert lumière utilisés par exemple par ASADA et MATSUMOTO (1967) ne nous ont donné aucun résultat.

Contrairement à la subérisation qui se manifeste par une adjonction de substances (crustation) à la paroi cellulaire, la lignification se produit par dépôt de lignine dans l'armature cellulosique (incrustation). Elle n'est pas continue sur toute la paroi cellulaire, mais se présente en mosaïque.

c) Identification du mycelium intracellulaire.

Après coloration au BBP-Hg, le mycelium apparaît coloré en bleu ; son identification est aisée, car il a une forme caractéristique. Il est très fréquent dans les cellules à paroi liégeuses, mais inexistant dans les cellules saines.

Des coupes longitudinales et transversales nous ont permis d'observer au centre de certaines cellules des aggrégats myceliens faisant penser au début de la formation des sclérotés de certains champignons (TOWNSEND et WILLETTS 1954). PREECE (1964) décrit de telles formations, mais contre les parois cellulaires.

.../...

Nous ne pensons pas que ces aggrégats myceliens soient de vrais sclérotés, mais plutôt une condensation d'hyphes identique à celle de certains champignons des mycorrhizes endotrophes. Cette* condensation pourrait donc jouer un rôle dans la conservation du parasite en augmentant sa survie dans les débris racinaires et dans le sol (cf Tableaux VI, VII).

III - Conclusion et discussion :

D'après GAUMANN (1950), une réaction de défense vise à affaiblir le parasite et à le tuer. Une telle réaction entraîne la localisation de l'infection et l'apparition des symptômes caractéristiques de la maladie.

De nombreux travaux ont été effectués sur les épaississements des membranes cellulaires à la suite de l'infection par divers agents pathogènes. Parmi ceux-ci, TISDALE (1917) a mis en évidence une subérisation des parois des cellules d'avoine attaquées par Helminthosporium avenae, et du lin par Fusarium lini, YOSHII (1948) a montré que les feuilles de Tomate inoculées avec Piricularia oryzae réagissent par une lignification au point de contact de la cellule avec l'appressoria du parasite, HUSSEY et KRUSBERG (1968) ont observé une subérisation des parois cellulaires des racines de Pois après attaque de Ditylenchus dipsaci.

Dans le cas de P. lycopersici, l'hôte réagit par une lignification, peut-être aux points d'entrée du parasite. Cependant, malgré la présence de cette barrière, le champignon continue sa progression. Des phénomènes analogues ont été rapportés par JONES (1931) pour la gale commune de la pomme de terre due à Streptomyces scabies, par GAUMANN (1950) pour le tabac infecté par Thielavia basicola.

Nous n'avons jamais observé le parasite ailleurs que dans les cellules brunes et subérifiées. Nous pensons donc que sa pénétration dans une cellule saine déclenche le processus de brunissement et de subérisation, et que c'est au cours de ce phénomène qu'il est en mesure d'attaquer les cellules saines voisines. En effet, ce passage des cellules attaquées vers les cellules saines serait possible soit parce que la subérisation des parois cellulaires est encore incomplète soit à la faveur de fissures de la membrane dûes à la croissance des tissus ou encore, grâce à un système enzymatique capable de dégrader la subérine.

Nous n'avons aucune preuve directe pour l'une ou l'autre de ces hypothèses. Cependant, comme nous le montrerons plus loin (cf Fig III), la fréquence d'isolement du champignon à partir des racines diminue avec l'aggravation des symptômes donc la généralisation du liège, le champignon se trouvant emprisonné dans les cellules subérifiées. Cette constatation appuie la première hypothèse, c'est à dire celle qui suppose que le passage d'une cellule attaquée vers une cellule saine se fait avant la subérisation totale des parois cellulaires. Il y aurait alors une réaction en chaîne : invasion d'une cellule saine, brunissement, invasion d'une autre cellule avant subérisation etc...

Comment pouvons-nous alors expliquer la non généralisation des symptômes à toute l'écorce ? Deux hypothèses sont à envisager :

- l'épaississement des parois cellulaires constitue un mécanisme de défense, mais dont la mise en action est d'abord assez lente pour ne pas empêcher la progression du parasite, puis serait susceptible de s'accélérer et de conduire à la formation d'une barrière liégeuse et efficace. Il s'agit d'une hypothèse qui concorde avec les phénomènes observés, c'est-à-dire arrêt de la croissance du champignon aussi bien dans le sens radial de la racine que dans le sens longitudinal. Nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse par l'obser-

vation étant donné l'impossibilité de mesurer la vitesse de subérisation des parois cellulaires où s'accumulent très vite des substances brunes.

- La présence de Phytoalexines dans les tissus profonds du Cortex des racines âgées empêche le champignon d'atteindre le cylindre central. Ces tissus joueraient alors le rôle de "tissus fongistatiques" (GAUMANN 1950) comme dans le cas de la Septoriose du céleri ou de la Fusariose des céréales.

D-Succession de différents champignons sur les racines:

I - Matériel et méthodes.

1) Succession de *P. lycopersici*, *C. coccodés* et *F. oxysporum*.

Les plantes (variété Montfavet) de sept semaines (4 semaines en motte et trois semaines en pot) sont repiquées normalement en serre au mois d'avril. Le moment du repiquage sera le temps 0. Aussi durant tout notre exposé, l'âge des plantes que nous indiquerons sera celui du séjour des plantes en serre, c'est à dire en sol infesté et non l'âge réel des plantes.

Tous les 15 jours et jusqu'à 105 jours, des plantes sont arrachées et leur système racinaire examiné. Nous utilisons ces derniers d'une part, pour la mise en évidence de la succession de différents champignons sur les racines, d'autre part pour des études respirométriques et enzymatiques (cf IIIème partie).

Les isollements sont effectués à partir de régions saines et liégeuses. Trente fragments de 1 cm chacun sont lavés à l'eau cou-

rante pendant 1 heure, stérilisés superficiellement au Hg cl_2 1 %, puis ensemencés sur un milieu (PDA + L + A) à raison de cinq fragments par boîte de Pétri.

L'énumération des champignons est effectuée 10 jours plus tard pour C. coccodés et F. oxysporum et 15 jours pour P. lycopersici.

2) Variations morphologiques de P. lycopersici.

Nous avons déjà mentionné l'existence de plusieurs souches de P. lycopersici, différentes par la couleur, la vitesse de croissance, la présence ou l'absence de sclérotés.

Nous décrivons six souches reçues de l'I N R A de Montfavet et deux souches que nous avons isolées à partir de racines liégeuses.

Les différentes souches de P. lycopersici sont repiquées en boîte de Pétri sur milieu (PDA + L). Leurs caractéristiques morphologiques sont déterminées après une incubation de 14 jours à 26°.

Pour la détermination de leur croissance mycelienne respective, le substrat (PDA + L) est réparti dans des tubes de croissance présentant un étranglement (SCHEFFER 1935) à l'aide d'une seringue pour éviter tout dépôt de gélose sur les parois des tubes, et à raison de 4 ml par tube. Après stérilisation à l'autoclave, les tubes sont maintenus en position horizontale jusqu'à solidification de la gélose. L'ensemencement est effectué près de l'étranglement du tube avec un disque d'inoculum de 0,5 cm de diamètre prélevé à la périphérie d'une culture de 15 jours. La mesure de la longueur des colonies est effectuée après 14 jours d'incubation des tubes en position verticale à 26°.

.../...

3) Croissance mycelienne linéaire de F. oxysporum, C. coccodés et P. lycopersici.

Nous utilisons pour cette détermination les mêmes tubes que précédemment. L'ensemencement des tubes est effectué à partir de culture de 15 jours pour P. lycopersici et de 10 jours pour C. coccodés et F. oxysporum. La croissance mycelienne totale est mesurée tous les quatre jours.

II - Résultats.

1) Succession de P. lycopersici, C. coccodés et F. oxysporum :

Les champignons les plus fréquemment isolés des racines de tomate tout au long de la période végétative sont : P. lycopersici, C. coccodés, Fusarium sp. Nous trouvons aussi, mais dans une proportion moindre des espèces comme Chaetomium sp., Cephalosporium sp., Trichoderma viride, Penicillium sp.

Nous représentons sur la Fig(III) la distribution des trois parasites les plus importants des racines de tomate : P. lycopersici, C. coccodés et F. oxysporum.

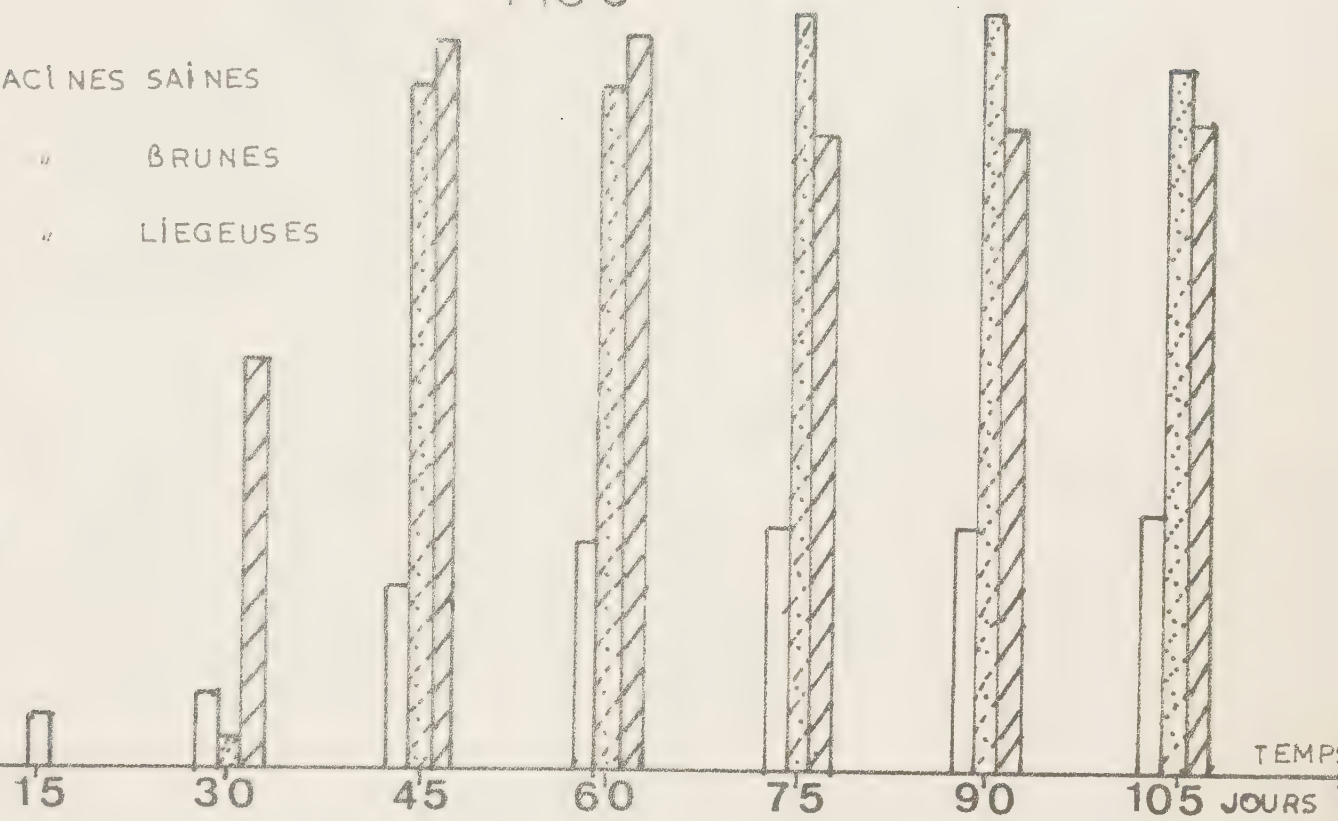
A 15 jours, le seul champignon isolé est P. lycopersici. Les jeunes racines de tomate sont donc attaquées en premier par ce parasite , bien avant l'utilisation de tous les autres. Au cours du développement du système racinaire, d'autres champignons viennent s'ajouter au premier. D'abord F. oxysporum entre le 15 ème et le 30 ème jour, ensuite C. coccodés entre le 45 ème jour et le 60 ème jour.

La fréquence d'isolement (rapport entre le nombre de fragments colonisés et le nombre de fragments ensemencés) de P. lycopersici à partir des racines saines va en augmentant jusqu'au 60 ème

FIG 3

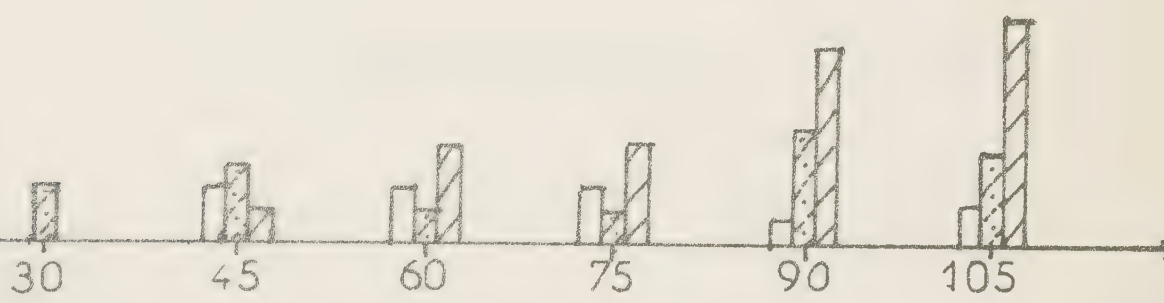
RACINES SAINES
" BRUNES
" LIÉGEUSES

A

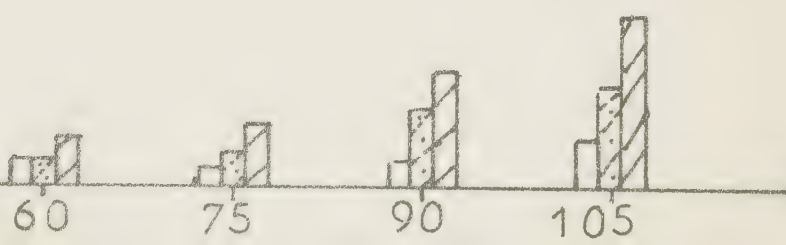


SUCCESSION ET FREQUENCE D'ISOLEMENT DE
P. LYCOPERSICI (A), F. OXYSPORUM (B), C. COCCODES (C)

B



C



jour pour suivre ensuite un palier régulier. Ceci est dû à la généralisation de l'infection aux régions saines et non à sa présence dans le rhizoplane puisque les racines ont été stérilisées avant leur ensemencement en boîte de Pétri. Les nécroses peuvent en effet être réduites à un nombre de cellules tellement limité qu'elles passent inaperçues. La racine tout en étant contaminée paraît ainsi être indemne.

Dans les racines brunes et liégeuses, la fréquence d'isolement de P. lycopersici augmente rapidement pour atteindre 90 % en 45 jours. Cependant, si dans les deux premiers mois, la fréquence d'isolement à partir des racines brunes est légèrement inférieure à celle des racines liégeuses, l'inverse se produit après le 60ème jour. La fréquence d'isolement de P. lycopersici diminue donc avec l'aggravation des symptômes.

Entre le 45ème et le 60ème jour, il y a apparition de C. coccodés et F. oxysporum devient plus fréquent. Le pourcentage d'isolement de ces deux champignons devient aussi plus important pour les racines liégeuses. Nous pouvons donc penser que par leur vitesse de croissance supérieure (cf Tableau XI), ils entravent la manifestation de P. lycopersici, ce qui expliquerait la diminution de la fréquence d'isolement de ce champignon à partir des racines liégeuses.

2) Variations morphologiques de P. lycopersici :
cf Planche (IV) et tableau X.

Les souches de P. lycopersici diffèrent par la couleur, le taux de croissance, la présence ou l'absence de sclérotés et la pathogénie.

La description de huit isolats de ce champignon figure dans le tableau (X).

Caractéristiques		Provenance	croissance linéaire (en cm)	Recto de la colonie
Reçues	1	Pays-Bas (1960)	2,3	Pas de clérotes, contour des colonies irrégulier, mycelium aérien blanc rosé, réparti uniformément sur toute la colonie.
	2	Rocheford du Gard (1960)	2,4	Sclérotes nombreux, de dimension réduite. Secteur central formé d'un mycelium grisâtre surélevé. Le secteur périphérique est formé d'un mycelium rasant.
	3	Rocheford du Gard (1960)	2,5	Pas de sclérotes, mycelium aérien blanchâtre assez développé, réparti uniformément au centre de la colonie.
	4	Montfavet (1963)	3,1	Pas de sclérotes, mycelium aérien blanc jaunâtre assez développé, colonie imparfaitement définie, car gélose apparemment liquéfiée.
	5	Montfavet (1965)	2,3	Pas de sclérotes, mycelium aérien blanc rosé assez développé, surélevé au-dessus de la gélose. Secteur central bombé.
	6	LIBAN (1966)	3,2	Sclérotes se formant à la périphérie des colonies, mycelium aérien développé, surélevé réparti uniformément sur toute la colonie. Secteur central bombé.
Isolées	D	S ^t Max	3,2	Les cinq colonies se rejoignent et forment un ensemble homogène. Mycelium aérien très dense, surélevé, blanc grisâtre.
	L	S ^t Max	2,9	Souche morphologiquement identique à la souche 6. sclérotes moins nombreux.

Verso de la colonie

tre secteurs distincts. Un secteur central grisâtre, 2 secteurs médians brunâtres et secteur externe blanc brunâtre. Celui-ci a un contour externe irrégulier, le mycelium forme des aggrégats d'hyphes parallèles ayant l'aspect de "soies".

sence uniforme de sclérotés.

secteurs. Le secteur externe est rosâtre - Secteur moyen blanc brunâtre - Secteur central brunâtre.

onnie imparfaitement définie et d'aspect brunâtre.

actérisé par trois secteurs parfaitement définis : blanc rosé, brun clair, brunâtre, gélose est légèrement liquéfiée.

pect uniforme et gris foncé.

la ligne de contact entre colonies se forme un secteur noirâtre dans lequel se trouvent les sclérotés.

pect uniforme et gris foncé.

au X

Pyrenochaeta lycopersici.

Nous utilisons dans toutes nos expériences la souche L, souche morphologiquement identique à celle isolée au Liban.

3) Croissance mycelienne linéaire de *P. lycopersici*, *C. coccodés* et *F. oxysporum*.

La croissance mycelienne linéaire des trois champignons figure dans le tableau suivant :

Temps en jours Parasite	4	8	12	14
<u>F. oxysporum</u>	3,2	5 (0,45)	7,6 (0,65)	9,12 (0,75)
<u>C. coccodés</u>	2,4	3,4 (0,25)	5,05 (0,41)	5,8 (0,38)
<u>P. lycopersici</u>	1,6	2,07(0,12)	2,6 (0,13)	2,98 (0,19)

TABLEAU XI

croissance mycelienne linéaire totale (en cm).

milieu (PDA + L) t = 26°.

Les chiffres entre parenthèses indiquent la vitesse de croissance par jour des trois champignons. Ainsi, du 4ème au 8ème jour, la croissance est de $(5 - 3,2) = 1,8$ cm, donc de 0,45 cm par jour.

La croissance linéaire de F. oxysporum et de C. coccodés est nettement supérieure à celle de P. lycopersici. Du 4ème au 8ème jour et du 12ème au 14ème jour, les vitesses de croissance sont dans le rapport 4/2/1.

III - Conclusion et discussion.

Dans une serre stérilisée superficiellement à la vapeur, nous trouvons 45 jours de décalage entre l'apparition de P. lycopersici et de C. coccodés sur les racines de tomate. Comment peut-on expliquer ce retard dans l'apparition de C. coccodés et surtout la précocité de celle de P. lycopersici ?

D'après EBBEN (1959), la vapeur a un effet très net et plus important sur C. coccodés que sur P. lycopersici. De plus, le premier champignon peut être isolé du sol (FORLOT 1965) et de la surface des racines (WILLIAMS et EBBEN 1951).

EBBEN et WILLIAMS (1956) observent un mois de décalage dans l'apparition de C. coccodés en sol traité et non traité à la vapeur. Nous pensons avec ces auteurs que ce retard est dû au temps nécessaire, d'une part aux racines pour traverser l'horizon traité, d'autre part, au champignon pour progresser des couches profondes non traitées vers les couches superficielles traitées, dans ou le long des racines.

Nous ne pouvons établir aucune relation entre la fréquence de F. oxysporum et les différents symptômes, quoiqu'il soit plus abondant dans les racines liégeuses. Il est à noter que ce champignon a été rarement isolé par EBBEN et WILLIAMS (1956).

Comment peut-on alors expliquer qu'un champignon, incapable de pousser dans le sol, sensible à l'action de la microflore antagoniste du sol (cf Fig (II)) et ayant une croissance très lente (cf Tableau XI), puisse infecter en premier la plante hôte ?

PARKINSON et coll (1963), PARKINSON et PEARSON (1967) ont montré que malgré leur croissance faible (cf Tableau XI) et leur

.../...

inaptitude à la colonisation saprophytique (cf Tableaux I, II, III), les champignons gris et stériles sont parmi les premiers colonisateurs des racines de plantules d'orge et de haricot, bien avant F. oxysporum, Trichoderma viride, Cylindrocarpon radicicola. De plus, ils persistent dans la racine avec le développement du système racinaire.

Ces mêmes auteurs, en cherchant la cause de l'entrée en activité précoce de ces champignons, montrent que les exsudats de racines d'orge stimulent davantage leur croissance mycelienne que celle de Fusarium oxysporum, Trichoderma viride, Zygorhynchus moellerii. Ils pensent alors que la stimulation des formes myceliennes pourrait être plus rapide que celle des espèces se conservant sous forme de spores ou autres organes de conservation.

Ce serait le cas pour P. lycopersici. Cependant, nous ignorons les mécanismes qui induisent l'entrée en activité du parasite. Peut-être s'agit-il de la sécrétion de substances nutritives levant la fongistase (JACKSON 1957, STOVER 1958, COCHRANE 1960).

E-Sensibilité variétale:

TERMOHLEN (1962) a montré que les variétés de tomate cultivées sont toutes sensibles à P. lycopersici, tandis que les espèces sauvages sont pour la plupart résistantes.

La station de pathologie végétale de Montfavet n'a pas pu se prononcer sur la résistance de L. peruvianum (communication personnelle), quoique TERMOHLEN (1962) ait décrit cette espèce comme résistante.

Notre étude a donc pour but de reprendre quelques variétés cultivées et quelques espèces sauvages, afin d'étudier leur sensibilité

d'une part au stade jeune plante (12 jours), d'autre part au stade plante (4 mois). Nous savons en effet que la résistance ou la sensibilité des plantules varie parfois avec l'âge. Il nous semble donc intéressant de suivre particulièrement l'évolution des différentes espèces sauvages afin de voir si leur résistance est ou non uniforme pendant toute la période végétative.

Au stade plantule, nous comparerons aussi la pathogénie de P. lycopersici à celle de C. coccodés et de F. oxysporum.

I - Matériel et méthodes :

1) Plantules de 12 jours :

a) variétés cultivées :

La nature et l'origine des semences des variétés cultivées figurent dans le tableau suivant :

Variétés	Provenance
Merveille des marchés	Job Nancy
Roma	Vilmorin
Casaque rouge	Vilmorin
Super marmande	Job Nancy
Marmande	Vilmorin
Saint-Pierre	Vilmorin
Marglobe	Job Nancy
Fournaise	Vilmorin

Les graines de tomate, stérilisées superficiellement au Hg cl_2 pendant 30 sec sont mises à germer sur un milieu de Hoagland gélosé : K NO_3 : 1,02 g ; $\text{Ca (NO}_3)_2$: 0,49 g ; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: 0,23 g ; $\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,42 g ; Agar : 20 g ; H_2O_d : 1 000 ml.

Après sept jours d'incubation à la température ambiante, les plantules n'ayant pas atteint le stade cotylédonaire sont éliminées et les autres inoculées avec des disques ($\varnothing = 1$ cm) prélevés sur une culture gélosée de 15 jours pour P. lycopersici et de 10 jours pour C. coccodés et F. oxysporum. Les disques sont placés face supérieure vers le bas, en contact direct avec l'extrémité des racines poussant sur la gélose nutritive.

La pathogénie est appréciée par la mesure des nécroses visibles sur les racines.

b) Espèces et variétés sauvages :

La provenance et la date de récolte des espèces et variétés utilisées figurent dans le tableau ci-dessous :

Espèces et variétés	Récolte	Provenance
<u>Lycopersicum peruvianum</u> (L). Mill.	1965	I N R A Montfavet
<u>Lycopersicum hirsutum</u> Humb et Bonpl.	1965	I N R A Montfavet
$\underline{F}_1$: <u>L. esculentum</u> Mill XL. <u>hirsutum</u>	1965	I N R A Montfavet
<u>Lycopersicum pimpinellifolium</u> (Jusl)-Mill.	1964	Ottawa (Canada)
Espalier	1966	I N R A (Montfavet)

Espalier peut être classé botaniquement dans Lycopersicum esculentum var. cerasiforme (Dun) A. GRAY. Elle a été redécouverte dans les collections de l'I N R A à Versailles en 1955 (communication personnelle). Pour la commodité de l'exposé et pour ne pas faire de confusion avec L. esculentum (variétés cultivées), nous continuerons à l'appeler Espalier.

Pour obtenir les plantules, nous procédons comme précédemment.

Comme la longueur des racines dépend de l'espèce ou de la variété, nous adoptons comme critère d'appréciation un pourcentage d'attaque, c'est à dire le rapport entre la longueur des lésions et la longueur totale des racines.

Nous étudierons aussi à titre comparatif une variété sensible : Saint-Pierre.

2) Plantes de quatre mois :

Généralement, le séjour de la Tomate en serre est de 5 à 6 mois. Le choix de 4 mois est arbitraire et n'est justifié que par l'impossibilité d'avoir des plantes plus âgées et en pleine vigueur en salle de culture.

a) Obtention des plantes :

Comme précédemment, l'étude portera sur des plantes de tomates sauvages et cultivées.

Plantes sauvages :

- L. hirsutum Humb et Bonpl.
- L. peruvianum (L) Mill.
- Espalier.

Plantes cultivées :

- L. esculentum Mill (Institut de Botanique, Tapioszelle, Hongrie).

- L. esculentum var Saint-Pierre.

Les plantes sont cultivées en pot au laboratoire.

Les semences sont mises à germer au préalable dans des mottes de terreau de 3,5 x 3,5 x 5 cm. A trois semaines, les plantules sont repiquées avec leur motte dans des pots contenant d'une part de la terre infestée (1 volume inoculum + 3 volumes de terre stérilisée) d'autre part de la terre non infestée (1 volume sable stérile + 3 volumes de terre stérilisée).

La conduite de l'expérience et la salle de culture ont été déjà décrites (cf P 49).

Les mêmes plantes de 4 mois nous serviront à des études respirométriques et enzymatiques (cf IIIème Partie).

b) Isolement du champignon.

Après lavage abondant des racines et stérilisation superficielle au $Hg\ Cl_2$, 30 fragments de racine par variété ou espèce, choisis à la sortie de la motte de terreau sont ensemencés sur milieu (PDA + L + A). La lecture des boîtes est effectuée après incubation de 15 jours à 26°.

.../...

II - Résultats :

1) Plantes de 12 jours.

a) Sensibilité de jeunes plantes de tomates vis à vis de P. lycopersici, C. coccodés et F. oxysporum

La sensibilité des différents cultivars et espèces vis à vis de ces trois parasites figure dans le tableau XII.

Ce tableau montre que :

- Toutes les variétés de tomate cultivées sont sensibles à P. lycopersici et que seulement certaines le sont à C. coccodés et à F. oxysporum.

- Les lésions causées par P. lycopersici sont généralement plus importantes.

- Merveille des marchés, Super marmande, Fournaise et Marglobe sont résistantes à C. coccodés, ce qui confirme les résultats de FORLOT (1965)

- Saint-Pierre et Marmande sont résistantes à F. oxysporum, ce qui est en accord avec les observations de l'I N R A de Montfavet (I N R A 1964).

.../...



variété	<u>P. lycopersici</u>	<u>C. coccodés</u>	<u>F. oxysporum</u>
Merveille des marchés	14	3 R	12
Roma.	11	11	9
Casaque rouge	15	10	8
Super marmande	13	5 R	9
Marmande	14	16	4 R
Saint-Pierre	16	12	5 R
Marglobe	19	3 R	10
Fournaise	17	4 R	9

Tableau XII.

Longueur moyenne des lésions (en mm) sur les racines de jeunes plantes de 12 jours poussant à la température ambiante dans une solution de Hoagland gélosée après infection par des disques de cultures des 3 champignons cités.

R : Plantules résistantes.

.../...

Ainsi, des huit variétés étudiées, seules Roma et Casaque rouge sont sensibles aux trois parasites. Aucune n'est résistante à la fois à C. coccodés et à F.oxysporum, ce qui montre que les mécanismes de résistance mis en oeuvre par les différentes variétés à l'infection par les trois pathogènes sont probablement différents.

b) Sensibilité des jeunes plantes d'autres espèces ou variétés vis à vis de P. lycopersici.

Le taux d'attaque des différentes espèces ou variétés figure dans le tableau XIII.

Espèces ou variétés	attaque en %	Témoin	Sensibilité (S) ou Résistance (R)
<u>L. pimpinellifolium</u>	84	0	S
<u>L. peruvianum</u>	15	2,5	R
Espalier	8	2	R
<u>L. hirsutum</u>	11	1,3	R
<u>F₁ : L.escu XL. hirsutum</u>	7	0,8	S

Tableau XIII.

Taux d'attaque (en %) de jeunes plantes de 12 jours poussant à la température ambiante dans une solution de Hoagland gélosée après infection avec des disques de culture de P. lycopersici

Nous avons aussi reporté sur le Tableau XIII, les nécroses observées sur les racines des témoins quoique ces derniers n'aient pas été inoculés. Ces nécroses sont d'origine physiologiques.

Au stade 12 jours, les espèces sauvages testées se montrent toutes résistantes (à l'exception de L. pimpinellifolium).

2) Plantes de 4 mois : cf Planche VI.

a) variétés cultivées :

A quatre mois, quoique d'aspect vigoureux, les variétés cultivées montrent des symptômes de brunissement et de liège sur la presque totalité du système racinaire.

b) Espèces et variétés sauvages :

Nous n'avons pas étudié L. pimpinellifolium, cette espèce s'étant révélée être sensible au stade plantule. Quant aux plantes F_1 elles se sont flétries en cours de végétation pour des raisons inconnues.

Après arrachage des plantes et lavage du système racinaire, nous observons que :

- L. peruvianum et Espalier sont sensibles à P. lycopersici. L'attaque est moins spectaculaire que pour Saint-Pierre et L. esculentum, puisque les tâches de nécroses sont moins nombreuses. Cependant, les plantes restent aussi vivantes et vigoureuses que les variétés cultivées.

- L. hirsutum se révèle être une espèce très résistante, car il n'y a aucune différence entre le système racinaire des

témoins et des plantes croissant en sol infesté, les uns et les autres montrent des petites lésions dont l'ensemencement ne nous a pas donné de colonies de P. lycopersici (cf Tableau XIV).

Ces différences dans l'attaque ne peuvent provenir de la variation en longueur des systèmes racinaires, puisque d'une part, l'inoculum est uniformément réparti dans les pots de culture, et d'autre part, à 4 mois, la distribution des racines est générale et uniforme dans les pots de culture.

Des isollements à partir des différents tissus nous permettent de déceler la présence ou l'absence du parasite dans les tissus.

c) Isolement :

Le tableau XIV rapporte les résultats obtenus par le comptage des colonies de P. lycopersici issues de différents fragments de racines.

Espèce ou variété	% de fragments hébergeant <u>P. lycopersici</u>		Sensibilité (S) ou Résistance (R)
	Terre infestée	Terre non infestée	
<u>L. hirsutum</u>	0	0	R
<u>L. peruvianum</u>	23	0	1/2 S
Espalier	43	0	1/2 S
Saint-Pierre	33	0	S
<u>L. esculentum</u>	46	0	S

Tableau XIV.

nombre de fragments de racines (en %) ayant donné des colonies de P. lycopersici après ensemencement sur milieu à base de PDA $t^{\circ} = 26^{\circ}$.

Les chiffres figurant dans ce tableau montrent que :

- le % d'isolement ne donne aucune idée sur la plus ou moins grande sensibilité des différentes espèces et variétés, car d'une part, il repose sur le taux d'infection des régions atteintes et non de la totalité du système racinaire, d'autre part, comme nous

.../...

l'avons déjà montré (cf fig III), l'isolement du parasite à partir des racines augmente avec l'avancement de la période végétative et diminue avec la formation du liège. Donc, l'absence de corrélation entre sensibilité et fréquence d'isolement à partir des régions atteintes pourrait être due à la subérisation plus ou moins importante de chaque espèce ou variété.

- P. lycopersici semble être absent des racines de L. hirsutum.

III - Conclusion et discussion :

P. lycopersici est capable d'infecter et de coloniser les jeunes plantes de toutes les variétés cultivées (cf tableau XII). Par contre la variété et l'espèce Espalier et L. peruvianum ne sont attaquées qu'à un stade bien plus avancé.

La moindre sensibilité de ces deux plantes est donc au moins liée à un retard dans l'attaque de leur système racinaire. Ce retard et la faible croissance du champignon dans les tissus (cf P 53) réduisent le nombre des cellules atteintes et augmentent ainsi la résistance des plantes.

Cependant, comment peut-on expliquer que cette espèce et cette variété soient résistantes uniquement au stade jeune plante ?

Trois hypothèses peuvent être formulées :

- Exsudats racinaires : les exsudats racinaires des jeunes plantes peuvent ne pas stimuler l'entrée en activité du champignon. BUXTON (1957) a montré que les exsudats racinaires des pois sensibles

constituent un meilleur substrat pour la croissance de F. oxysporum f. pisi que ceux des variétés résistantes.

- Parois cellulaires de l'hôte : les parois cellulaires des espèces et variétés tolérantes peuvent être plus difficiles à franchir que celles des variétés sensibles. Pythium debaryanum traverse plus facilement les parois cellulaires des variétés sensibles de pomme de terre (HAWKINS et HARLEY 1919).

- Production de substances toxiques par l'hôte (WOOD 1967).

Ce sont là des hypothèses qui mériteraient d'être vérifiées.

Au stade actuel de notre étude (cf IIIème Partie), le cas de L. hirsutum semble être plus simple puisque le champignon n'a pas été isolé des racines. Deux cas sont alors à envisager :

- Le parasite n'a pas pénétré dans la racine. L. hirsutum n'est pas un hôte pour le champignon. Or, nous savons que ce n'est pas le cas, puisque TERMOHLEN (1962) et LAST et EBBEN (1966) ont réussi à le réisoler à partir de cette espèce.

- Le parasite a pénétré dans la racine. La plante réagit alors violemment soit en l'éliminant, soit en limitant sa progression. Dans le premier cas, nous sommes alors en présence d'un phénomène d'hypersensibilité, donc d'une résistance monogénique, résistance que nous pourrions peut-être confirmer en essayant diverses souches de P. lycopersici. Dans le second cas, la méthode d'isolement utilisée serait inadéquate.

Nous reviendrons sur ces problèmes dans nos études sur les activités polyphénol oxydase (PPO) et ascorbique oxydase (AO) des différentes espèces et variétés de tomate (cf IIIème partie).



Les études histochimiques nous ont permis de mettre en évidence les principales réactions de la plante à l'infection par P. lycopersici. Ces réactions sont en fait la conséquence de changements dans le métabolisme de l'hôte. Ceux-ci sont d'ordres très divers, mais peuvent intéresser entre autres la respiration et certains aspects des tissus infectés.

Le rôle des phénolases (PPO) et de l'ascorbique oxydase (AO) dans les phénomènes de brunissement a été très étudié (POLITIS, 1962). De même, de nombreuses expériences ont été réalisées pour établir une relation entre leurs activités et le degré de résistance des plantes attaquées.

Certains phénols participent aussi à la formation du suber et de la lignine (POLITIS 1948, SIMONDS et coll 1953).

Cependant, malgré ces fortes perturbations métaboliques au sein de la cellule végétale, le parasite continue sa progression et semble ainsi être très tolérant aux réactions de défense de la plante.

Il nous semble donc logique, après avoir étudié la conservation du parasite dans le sol et la colonisation de la plante, de consacrer la troisième partie de notre travail à certains aspects des interactions hôte-parasite, à savoir :

- Etude de la respiration des tissus attaqués en fonction du développement de la maladie et de la sensibilité ou résistance de différentes espèces et variétés de Lycopersicum.
- Les variations des activités PPO et AO au cours de la manifestation des symptômes.
- Les variations des activités PPO et AO, et leurs relations avec la sensibilité variétale.
- La tolérance de P. lycopersici aux réactions de défense de la plante et sa participation dans la manifestation des symptômes.

TROISIEME PARTIE

QUELQUES INTERACTIONS HOTE-PARASITE.

CHAPITRE I

TECHNIQUES ET CONDITIONS EXPERIMENTALES.

=====

La consommation d' O_2 due à la respiration des tissus racinaires de tomate et aux activités polyphénol oxydase (PPO) et ascorbique oxydase (AO) sera mesurée par la technique manométrique différentielle à l'aide d'un respiromètre GILSON. Aussi, afin de ne pas nous répéter, commencerons-nous par donner quelques généralités sur ces méthodes respirométriques avant de décrire les expériences et les conditions exactes de réalisation.

A- Généralités sur les methodes respirométriques:

Le respiromètre GILSON dont nous disposons est pourvu de quatorze fioles de Warburg.

I - Préparation des fioles :

1) Mesure de la respiration :

Les fragments de racines dont nous voulons mesurer la respiration sont placés dans le compartiment central de la fiole de Warburg, compartiment contenant 1 ml de milieu de White (WHITE 1946) et 1 ml de tampon phosphate pH = 6,7 (tampon de Michaelis : 1 volume de $PO_4 KH_2$ N/10 pour 1 volume de $PO_4 Na_2 H$, 2 H_2O N/10). L'ampoule latérale de la fiole contient 0,5 ml de saccharose. Un papier Whatman plié en accordéon et imbibé de 0,2 ml de KOH à 20 % est placé dans le puits central. Nous effectuons quatre mesures par lot de racines.

Le poids des racines étudiées est évalué après passage à

.../...

l'étuve à 110° pendant 14 heures. Le QO_2 est exprimé en $ul\ O_2/g/mn.$

2) Mesure de l'activité PPO :

2 ml des extraits enzymatiques de racines ou de mycelium sont placés dans le compartiment principal des fioles de Warburg. L'ampoule latérale contient 0,5 ml de phénol à 0,01 M. L'activité PPO est exprimée en $ul\ O_2/g/mn.$

3) Mesure de l'activité AO :

Dans l'ampoule latérale, nous remplaçons le phénol par 0,5 ml d'acide ascorbique 0,12 M.

II - Mise en température des fioles.

Les quatorze fioles ainsi préparées sont montées sur le respiromètre puis soumises à une agitation d'amplitude égale à 3 cm et à une fréquence d'oscillation de 110 mn. La température du bain est de 26°. Nous adoptons une mise en température des fioles d'une durée de 30 mn.

III - Mesure proprement dite :

Après 30 mn de mise en température du bain et des fioles, nous effectuons le mélange des différents constituants de la fiole de Warburg. Nous retirons celle-ci rapidement de l'eau et nous versons le contenu de l'ampoule latérale (acide ascorbique, phénol, saccharose suivant l'expérience) dans le compartiment central. Une fois le mélange effectué, nous remettons la fiole en place. C'est le temps 0 de l'expérience.

.../...

B- Perturbations physiologiques de l'hôte:

I - Altération de la respiration :

1) En fonction du développement de la plante et des symptômes.

a) Obtention des racines.

Les plantes (variété Montfavet) sont obtenues en serre. Nous rappelons que l'âge des plantes indiqué est celui de leur séjour en serre, mais non leur âge réel.

Tous les 15 jours et pendant 90 jours, des plantes sont arrachées. Des fragments de racines de 1 cm sont prélevés à la sortie de la motte de terreau, c'est-à-dire à un endroit où il est possible de rencontrer des racines saines, brunes et liégeuses, situées à un même niveau et que nous supposons donc être de même âge.

b) Préincubation des racines :

Après un lavage abondant à l'eau, les fragments de racines sont séchés entre deux feuilles de papier filtre puis mis en incubation pendant 12 h dans une solution de White (WHITE 1946), ceci afin de permettre une cicatrisation partielle des blessures et une reprise d'activité normale. Les racines sont ensuite placées dans les fioles de Warburg et leur respiration déterminée.

2) En fonction de la sensibilité variétale.

Pour cette étude, nous utilisons cinq espèces et variétés

.../...

de tomates : L. hirsutum, L. peruvianum, Espalier, L. esculentum, Saint-Pierre. L'obtention des plantes de quatre mois en salle de culture est faite d'après la technique déjà décrite (cf P⁴⁹).

Le prélèvement, la préincubation des racines et la mesure de la consommation d'oxygène sont effectués comme précédemment.

3) Influence des filtrats de culture.

a) Obtention des filtrats de culture.

Après une période d'incubation de 15 jours en culture agitée (cf P²²), nous séparons le mycelium du filtrat au moyen d'un creuset muni d'un papier filtre et en communication avec une pompe à vide. Après passage au filtre millipore (0,45 μ), le filtrat de culture est ramené à pH = 5,5 (pH final d'un milieu Czapek-Dox) avec une solution Hcl 0,1 N non stérile.

b) Obtention des racines :

Les mêmes espèces et variétés sont mises à germer dans des boîtes de Pétri sur eau gélosée à 10 %. Après l'apparition de la radicule, elles sont placées dans des pots contenant de la terre préalablement stérilisée pendant 2 heures à l'oxyde d'éthylène à 60°. Les pots sont arrosés tous les deux jours à l'eau courante et pendant un mois. Les plantules sont ensuite soigneusement arrachées, débarrassées des particules de terre qui y adhèrent par un lavage abondant à l'eau. Les racines sont enfin séparées de l'hypocotyle avec une lame de rasoir.

c) Mise en incubation des racines :

Les racines sont mises à incuber en boîte de Pétri

.../...

dans 10 ml de solution de White additionnée de 10 ml de filtrat de culture pendant 14 heures. Pour les témoins, nous remplaçons le filtrat par du Czapeck-Dox (pH = 5,5).

Nous plaçons ensuite les racines dans les fioles de Warburg et nous déterminons leur respiration.

II - Variations des activités PPO et AO au cours de la manifestation des symptômes.

1) Préparation des extraits enzymatiques.

Les plantes utilisées (variété Montfavet) sont des plantes obtenues en serre.

Tous les 15 jours, et pendant 105 jours, nous arrachons des plantes. Des fragments de racines de 1 cm sont prélevés comme précédemment. Après lavage abondant à l'eau du robinet, les racines sont finement découpées puis placées au congélateur à -20° pendant 12 heures afin d'arrêter toute activité enzymatique et faciliter le broyage. Elles sont ensuite broyées manuellement au mortier dans du tampon phosphate (Tampon de Michaelis pH = 6,7) préalablement refroidi à 0° , à raison d'un gramme de racines par 10 ml de tampon phosphate. Après élimination des gros débris, l'extrait de racines est passé au filtre millipore. Le liquide clair obtenu servira à mesurer les activités AO et PPO. Le substrat utilisé est le catéchol.

2) Présence de corps RH_2

Nous appelons ainsi les corps réducteurs (comme l'acide ascorbique) susceptibles d'être oxydés par l'extrait enzymatique de racines et pouvant ainsi influencer sur la consommation d'oxygène observée en présence du catéchol. Les extraits de racines saines, brunes et

.../...

liégeuses sont préparés comme précédemment à partir de racines de 60 jours. La méthode utilisée est celle décrite par HESS (1958) et que nous rappelons ci-dessous :

Les fioles de Warburg contiennent extrait enzymatique, KOH et catéchol. Au temps 0, les 0,2 ml de catéchol de l'ampoule latérale sont versés sur l'extrait enzymatique. La consommation d'oxygène est mesurée toutes les 15 mn et pendant une heure. L'agitation des fioles est arrêtée, et le tube de purge des fioles de Warburg retiré. Nous ajoutons une autre dose de catéchol et la consommation d'O₂ est mesurée de nouveau pendant une heure. Le même processus est répété une troisième fois. Les fioles sont agitées pendant toute la durée des mesures et 30 mn avant le début des mesures pour permettre leur mise en température.

3) Influence de l'acide ascorbique sur l'oxydation du catéchol.

Le compartiment central des fioles de Warburg contient l'extrait enzymatique, provenant de racines de 60 jours. Les ampoules latérales renferment l'acide ascorbique et le catéchol mélangés dans différentes proportions (cf Tableau XIX).

4) Spécificité de la PPO :

La spécificité de la PPO est déterminée en mesurant la consommation d'oxygène par différents phénols en présence de l'extrait enzymatique de racines de 60 jours.

Les phénols testés sont :

- Monophénols : P. Cresol, tyrosine.

.../...

- Orthodiphénols : Catéchol, Acide chlorogénique, acide caféique, acide protocatéchique.

- Para- diphénols : hydroquinone.

III - Variations des activités PPO, AO et sensibilité variétale :

Pour cette étude, nous utilisons cinq espèces et variétés : L. hirsutum, L. peruvianum, Espalier, L. esculentum et Saint-Pierre.

Ces différentes plantes sont obtenues en pot au laboratoire (cf P 49).

La préparation des extraits enzymatiques et la mesure des activités PPO et AO sont effectuées comme précédemment.

C- Tolérance de P. lycopersici aux réactions de défense de la plante et sa participation à la manifestation des symphômes :

I - Toxicité des phénols :

A partir d'une culture gélosée de 15 jours, nous découpons des disques de 1 cm de diamètre pour inoculer des fioles d'Erlenmeyer de 150 ml contenant 47 ml d'un milieu Czapek-Dox. Les phénols, stérilisés au préalable au millipore (3 ml à 10^{-2} M), sont ajoutés au milieu en même temps que l'inoculum. Ils sont à la concentration finale de $6 \cdot 10^{-4}$ M.

Les phénols sont remplacés par de l'eau distillée stérile dans les Erlenmeyers qui serviront de témoins. Les fioles (5 par série) sont placées sur agitateur pendant 15 jours à la température de 26°- 27°.

.../...

Le mycelium est ensuite séparé du filtrat de culture, lavé plusieurs fois à l'eau distillée, puis placé dans des vases à tare. Le poids sec est déterminé après passage à l'étuve pendant 14 heures à la température de 110°.

II - Activité PPO de P. lycopersici :

Les études pour la détermination d'une activité PPO sont effectuées d'une part sur les filtrats de culture (enzyme extracellulaire) et d'autre part sur les extraits de mycelium (enzyme intracellulaire).

1) Obtention du filtrat de culture :

La méthode d'obtention des filtrats de culture a été déjà décrite (cf P22).

La meilleure production de l'enzyme est généralement obtenue lorsque la croissance est partiellement supprimée (LEVINE 1966) et même en début d'autolyse (COCHRANE 1958). Dans ce dernier cas, les enzymes intracellulaires passent dans le milieu externe. Aussi, avons-nous utilisé pour cette expérience des cultures de 18 jours (cf Fig I), c'est-à-dire, lorsque le champignon est à sa croissance maximale.

Après séparation du mycelium, le filtrat de culture est passé au filtre millipore pour éliminer les cellules et débris mycéliens, puis ramené à pH = 6,7 avec une solution HCl 0,1 N. Le liquide clair obtenu servira aux tests enzymatiques.

2) Obtention de l'extrait mycelien :

Après lavage abondant à l'eau distillée, le mycelium provenant d'une fiole est transvasé dans le tube d'homogénéiseur

.../...

contenant 25 ml de tampon phosphate (pH = 6,7), puis broyé pendant 20 sec. Un deuxième broyage est effectué au mortier. Les gros débris sont éliminés par passage sur creuset muni d'un papier filtre, en communication avec une pompe à vide. L'extrait de mycelium est ensuite filtré au filtre millipore. Le liquide clair obtenu servira à la détermination de l'activité PPO.

3) Autooxydation des phénols :

La consommation d'oxygène résultant d'une autooxydation des phénols peut être non négligeable.

Le compartiment central des fioles de Warburg contient 2 ml de tampon phosphate (pH = 6,7), l'ampoule latérale renferme 0,5 ml de substrat. Le mélange tampon phosphate-phénol est effectué après une mise en température de 30 mn.

III - Production d'une B. glucosidase par P. lycopersici

1) Source de carbone :

L'aptitude de P. lycopersici à hydrolyser des glucosides tels que la salicine, l'arbutine est déterminée en faisant pousser le champignon dans un milieu Czapek-Dox modifié, ayant pour seule source de carbone les produits énumérés.

Nous utilisons deux concentrations (0,3 % et 2 %) pour chaque source de carbone et cinq fioles par concentration.

Les témoins sont constitués d'une part par des fioles non inoculées et contenant 50 ml de milieu Czapek-Dox avec les différents glucosides, d'autre part des fioles inoculées mais avec le

.../...

saccharose comme source de carbone.

Nous avons également utilisé l'acide tannique.

2) Mesure de l'activité B. glucosidase.

L'intensité de coloration du milieu de culture et la croissance pondérale du champignon servent comme indices de l'activité B. glucosidase. La croissance pondérale est déterminée en poids sec. L'intensité de la coloration est évaluée par des notes allant de 0 pour les non colorés (couleur jaune pâle = couleur naturelle du milieu de Czapek-Dox) à 6 pour les plus colorés (noirâtre).

PERTURBATIONS PHYSIOLOGIQUES DE L'HÔTE

=====

Dans cette étude, nous traiterons successivement :

- L'altération de la respiration

- Les variations des activités PPO et AO au cours de la manifestation des symptômes.

Les variations des activités PPO, AO et sensibilité variétale.

A- Altération de la respiration

Parmi les nombreux changements observés dans les tissus attaqués, l'altération de la respiration est l'un des plus importants et des plus impressionnants. La respiration fournit à l'hôte l'énergie nécessaire d'une part à ses processus métaboliques, d'autre part aux réactions de défense contre l'infection.

- Nous mesurerons l'altération de la respiration due à l'infection par P. lycopersici en estimant la consommation d'oxygène par unité de poids de tissus colonisés, comparée aux valeurs obtenues dans des conditions semblables avec des tissus sains. Le poids de racines étudiées est évalué après passage à l'étuve à 110° pendant 14 heures. Le QO_2 est exprimé en $ul\ O_2/g/mn.$

- Comme la réaction à l'infection dépend de l'espèce et de la variété, nous étudierons la respiration des racines saines et attaquées de différentes espèces et variétés afin de voir si la manifestation des symptômes et la résistance sont en corrélation directe avec cette

perturbation du métabolisme de l'hôte.

- Il est actuellement reconnu qu'un échange de substances peut se produire entre le parasite et son hôte. Ce concept implique une production de substances diffusibles ayant des effets plus ou moins importants sur la physiologie et le métabolisme de l'hôte (ALLEN 1953). Nous étudierons l'influence des filtrats de culture sur la respiration des racines de jeunes plantes de tomates sensibles, demi-résistantes, et résistantes, mais tout en pensant cependant qu'un filtrat de culture diffère des exsudats d'un mycelium endophyte.

I - En fonction du développement de la maladie et des symptômes.

1) Résultats :

La consommation d'O₂ par les racines de tomate (variété Montfavet) en fonction de l'âge et des symptômes figure dans le tableau XV.

Age en jours	Racines saines	Racines brunes		Racines légères	
		Consommation d'O ₂	en % de T	Consommation d'O ₂	en % de T
45	111	120	108	-	-
60	54	108	200	77	117
75	24	43	179	33	137
90	20	29	145	26	131

Tableau XV.

Consommation d'O₂ en ul/g/mn après incubation de 60 mn
milieu d'incubation : solution de White + TP + saccharose.

t = 26° T = témoin sain.

Il est bien établi que l'intensité respiratoire varie d'une part avec l'état de développement de la plante (LATCH et HANSON 1968) d'autre part avec l'infection par différents microorganismes (DALY et SAYRE 1957). Nous retrouvons ces phénomènes dans le tableau précédent.

- La consommation d'O₂ par les racines saines de 4 jours (111 ul/g/mn) est 5 fois supérieure à celle des racines de 90 jours (20 ul/g/mn). Ceci s'explique par le fait qu'à l'état jeune, les racines nécessitent davantage d'énergie pour leurs différentes synthèses (LATCH et HANSON 1968).

La consommation d' O_2 par les racines brunes et les racines liégeuses augmente dans de larges proportions par rapport à celle des racines saines. Elle est maximale à 60 jours, ce qui coïncide peut-être avec le développement végétatif maximum du parasite (ALLEN 1942). A partir du 60ème jour, la consommation d' O_2 par les racines attaquées diminue progressivement, mais reste cependant bien supérieure à celle des témoins sains.

Nous pensons que la respiration enregistrée pour ces mêmes témoins sains est supérieure à la réalité, car comme nous l'avons déjà observé (cf Fig III), des racines apparemment saines peuvent être infectées par le parasite.

- La respiration des racines brunes est toujours supérieure, quel que soit l'âge de la plante, à celle des racines liégeuses.

2) Conclusion et discussion :

Nos études histochimiques (cf planche IV) ont révélé la présence d'une quantité importante d'hyphes dans les tissus racinaires. La consommation d' O_2 observée peut donc être la résultante de la respiration du parasite et de celle des tissus de la plante.

LATCH et HANSON (1968), même après élimination d'Erysiphe polygoni des feuilles de trèfle, observent une forte augmentation de la respiration par rapport aux témoins sains. Nous pensons que la respiration du parasite intervient effectivement dans la consommation d'oxygène obtenue, mais des augmentations de 145 à 200 % (cf tableau XV) ne sont pas explicables par ce seul phénomène et correspondent très probablement à des perturbations physiologiques de l'hôte.

Nous avons noté que la consommation d' O_2 par les racines

brunes, indépendamment de leur âge, est toujours supérieure à celle des racines liégeuses. ALLEN (1942), SCHEFFER (1960), BECKMAN (1967), BLOSS et GRIES (1967) ont montré qu'aux premiers stades de toute infection (ici brunissement), la consommation d' O_2 est généralement supérieure à celle du dernier stade (ici formation du liège). Nous pensons donc qu'au stade BRR, les cellules ont encore un contenu qui consomme de l'oxygène, par contre, au stade liégeux, ces cellules sont, soit en voie de dégénérescence, soit complètement vides.

II - En fonction de la sensibilité variétale :

Nous avons montré que toutes les plantes des variétés cultivées de tomate sont sensibles à P. lycopersici, tandis que celles des espèces sauvages sont résistantes ou tolérantes (cf Planche VI). Il serait donc intéressant d'essayer d'établir une corrélation entre réponse à l'infection et sensibilité variétale.

1) Résultats :

Les résultats de la respiration des racines des différentes espèces et variétés figure dans le tableau XVI.

	<u>L. hirsutum</u>		<u>L. peruvianum</u>		<u>Espalier</u>		<u>L. esculentum</u>		<u>Saint-Pierre</u>	
	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S
	42,6	42,2	89,8	43,2	78,9	43,7	58,6	71,9	5,7	42,8
Consommation d'O ₂										
Sensibilité (S)	R		1/2 R		1/2 R		S		S	
Résistance (R)										

Tableau XVI.

Consommation d'O₂ en ul/g/mn

t = 25° pH = 6,7 incubation : 60 mn.

A : racines attaquées S = racines saines.

Il apparaît nettement d'après ce tableau que l'altération de la respiration des plantes de 4 mois est fonction de leur sensibilité, donc de l'aggravation de la maladie :

- Variétés et espèces sensibles : L. esculentum, Saint Pierre. La respiration des racines attaquées est nettement inférieure à celle des racines saines.

- Plantes demi-résistantes : L. peruvianum, Espalier. La respiration des racines attaquées est deux fois supérieure à celle des racines saines.

.../...

- Plantes résistantes : L. hirsutum.

Nous n'observons aucune altération de la respiration chez cette espèce.

Il est à remarquer que la respiration des racines saines est du même ordre (43 ul/g/mn) pour toutes les variétés et espèces sauf pour L. esculentum.

2) Conclusion et discussion :

Nous avons précédemment montré (cf. tableau XV) que la respiration des racines d'une variété sensible et attaquée (Montfavet) dépend de l'âge de la plante et des symptômes. Nous avons de plus noté qu'au cours du développement de la maladie s'opère une augmentation de la respiration suivie par une diminution.

Les résultats figurant dans le tableau XVI montrent que la respiration des différentes espèces et variétés de tomate coïncide avec le classement que nous en avons donné, et qui est basé sur leur résistance ou sensibilité (cf. tableau XIV). A quatre mois, les tissus brunis des plantes sensibles obtenues en pot au laboratoire sont en grande partie subérisés et morts, tandis que ceux des plantes demi-résistantes sont encore en grande partie au stade BRR et en pleine activité. Ces deux remarques confirment donc la conclusion que la moindre sensibilité de L. peruvianum et d'Espalier est due au moins en partie au retard dans l'attaque du système racinaire.

D'après nos résultats, le cas de L. hirsutum paraît plus simple puisque nous n'avons pas pu, d'une part réisoler le parasite des racines ayant poussé en sol infesté (cf. tableau XIV), d'autre part nous n'avons trouvé aucune modification dans la respiration des racines ayant poussé en sol infesté. Il semble donc logique de conclure, pour le moment, que L. hirsutum est une espèce immune.

Il serait très intéressant de reprendre toutes ces variétés et espèces sensibles et résistantes, de déterminer dans chaque cas le moment de la pénétration de P. lycopersici et l'importance de la consommation d'oxygène par les tissus au cours du développement de la maladie.

III - Influence du filtrat de culture de P. lyco :

Plusieurs auteurs ont attribué l'altération de la respiration observée chez de nombreuses plantes à l'action de substances toxiques produites par le parasite (ALLEN 1953).

D'après GAUMANN (1953) un champignon ne peut être pathogène que s'il produit des substances toxiques.

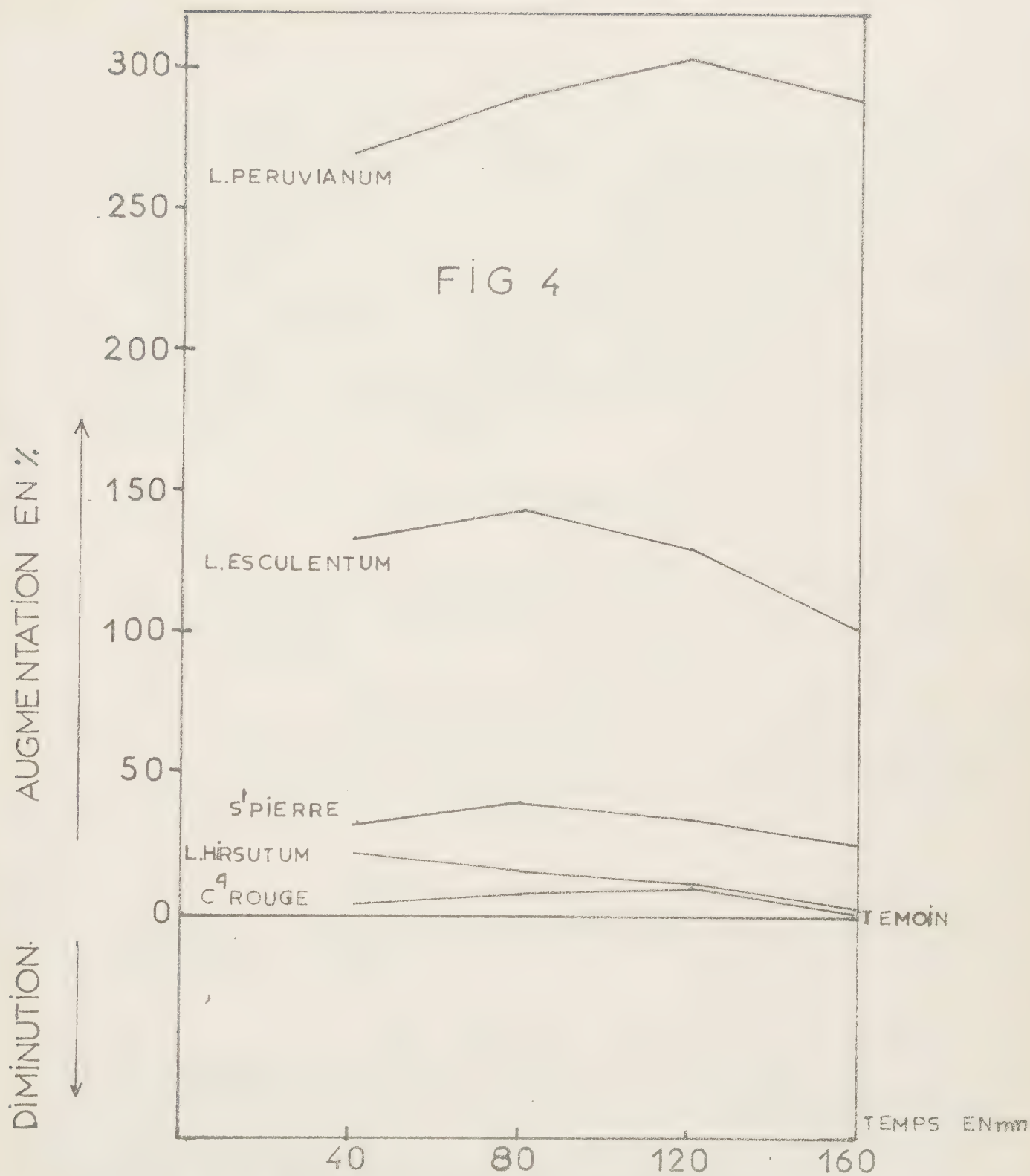
EBBEN et WILLIAMS (1956) ont observé un brunissement de jeunes racines de tomate en contact avec le filtrat de culture de P. lycopersici, ce qui est d'ailleurs en contradiction avec les résultats obtenus plus tard par TERMOHLÉN (1962).

Nous nous proposons donc d'étudier les altérations possibles de la respiration de racines de plantules de tomate sensibles, demi-résistantes et résistantes après contact avec le filtrat de culture.

Les résultats pourraient nous donner une idée d'une part du mode d'action du pathogène, d'autre part de certains aspects des mécanismes de résistance.

1) Résultats :

Les résultats obtenus sont reportés sur la Fig IV.



INFLUENCE DU FILTRAT DE CULTURE DE
P. LYCOPERSICI SUR LA CONSOMMATION DO_2 PAR
 DIFFERENTES PLANTES DE TOMATES

Il en ressort que le filtrat de culture renferme une substance qui augmente la respiration des racines traitées. Cependant, les différentes espèces et variétés ne réagissent pas de la même façon. Ainsi, nous ne retrouvons plus la différence entre plantes résistantes, demi-résistantes et sensibles. La respiration des racines de L. esculentum (sensible) augmente de 150 %, par contre, celle de Casaque rouge (sensible également) est très légèrement supérieure au témoin, et même inférieure à celle de L. hirsutum (résistante). Il est à constater que la respiration de L. peruvianum (demi-résistante) est quatre fois supérieure à celle des témoins.

2) Conclusion et discussion.

CHETVERIKOVA (1952) a observé une forte activation de la respiration en incubant des tissus de chou dans des filtrats de culture de Botrytis.

WHEELER et COLL (1958) ont examiné l'effet du filtrat de culture d'Helminthosporium victoriae sur la respiration de différentes variétés d'orge. Ils observent une augmentation de la respiration uniquement chez les variétés résistantes.

PRINGLE et SCHEFFER (1967) ont montré que les filtrats de culture de Periconia circinata n'ont aucun effet sur les variétés résistantes de Sorgho.

La Fig IV montre que l'effet du filtrat de culture de P. lycopersici sur la respiration n'est pas en relation avec la sensibilité ou la résistance, mais diffère suivant les espèces et variétés. Cette constatation pourrait expliquer les résultats contradictoires obtenus par EBBEN et WILLIAMS (1956) et TERMOHLEN (1962).

.../...

Si nous ne pouvons apporter aucune conclusion sur l'action des substances diffusibles, nous pouvons cependant penser que la résistance de l'hôte ne peut provenir de la suppression ou de la détoxification des métabolites toxiques du parasite.

B- Variations des activités PPO, AO au cours de la manifestation des symptômes:

Il est bien établi que l'augmentation de la respiration est étroitement liée aux changements quantitatifs de certaines enzymes (cytochrome oxydase, deshydrogénases etc...) participant à la respiration cellulaire. Mais les variations d'oxydases dont le rôle éventuel dans la respiration n'est pas exactement défini, ont été le plus souvent étudiées. Nous citerons comme exemples.

- Augmentation de l'activité AO dans les feuilles de riz atteintes par Cochliobolus miyabeanus (ASADA 1957) et dans les feuilles et tiges de tomate attaquées par F. oxysporum (SANWAL 1956).

- Augmentation de l'activité PPO dans les feuilles de tabac atteintes de virus (JOHN et WEINTRAUB 1967), dans les fruits de tomate attaqués par Eriwinia ananas (HALL et coll 1969) et dans les carottes infectées par Phoma rostrupii (KHAN DOBINA et GERASKINA 1969).

- Augmentation de l'activité peroxydase dans les feuilles de maïs attaquées par Helminthosporium carbonum (JENNINGS et coll 1969), dans les feuilles de betterave à sucre infectées par Cercospora beticola (RAUTELA et PAYNE 1970).

Ces mêmes auteurs et beaucoup d'autres (KEDAR 1959, UMAERUS 1959, FEHRMAN et DIMOND 1967) ont essayé d'établir une relation entre l'augmentation de l'activité de ces enzymes et les mécanismes de résistance de l'hôte.

.../...

Dans le cas de la maladie des racines liégeuses de tomate, brunissement et subérisation sont les symptômes les plus caractéristiques. Le mécanisme de brunissement chez les végétaux est encore obscur, mais nous savons qu'il est toujours associé à l'oxydation des phénols de la plante par l'intermédiaire d'enzymes présentant une activité PPO (FARKAS et KIRALY 1962, ROSSI 1962), et que l'intensité du brunissement dépend de la présence de corps réducteurs comme l'acide ascorbique (HATTORI et SHIROYA 1955, BLOSS et GRIES 1967). De plus, le brunissement (BRR) et la formation du suber sont sous la dépendance de phénols et phénolases (POLITIS 1948, SIMMONDS et coll 1953, FARKAS et KIRALY 1962).

Il nous semble donc intéressant d'étudier les activités PPO et AO dans les racines saines, brunes et liégeuses, tout au long de la période végétative de la tomate, de mettre en évidence la présence de corps réducteurs dans les racines saines, brunes et liégeuses, d'étudier l'influence de différents taux d'acide ascorbique sur l'oxydation d'un phénol, le catéchol ; enfin de déterminer la spécificité de la PPO de tomate afin de pouvoir la comparer plus tard à celle de la PPO de P. lycopersici. Ces études nous permettront peut-être de comprendre le rôle de ces deux enzymes dans le phénomène de brunissement des racines de tomates infectées.

I - Résultats :

1) Activité PPO :

Les résultats de cette activité enzymatique au cours du développement de la maladie figure dans le tableau XVII.

.../...

Temps en jours	Racines saines = Témoïn	Racines brunes		Racines liégeuses	
		ul d'O ₂	en % de T	ul d'O ₂	en % de T
45	50,6	51,2	101	-	-
60	26,1	32,7	144	47,1	180
75	47,1	63,9	135	53,7	118
90	38,5	43,1	111	41,3	107
105	43	48,8	113	44,7	103

Tableau XVII.

Consommation d'O₂ en ul/g/mn par 0,5 ml de catéchol (0,01 M) en présence de 2 ml d'extrait de racines (1 g pour 10 ml de TP pH = 6,7) après 60 mn d'incubation.

Du 45ème au 105ème jour, l'activité PPO des extraits de racines atteintes de BRR et des racines liégeuses est nettement supérieure à celle des racines saines.

En valeur absolue, l'activité PPO des racines saines semble être assez régulière tout au long de la période végétative. Cependant, au 60ème jour, nous constatons une chute aussi bien chez les racines saines que chez les racines attaquées, chute que nous ne pouvons expliquer mais qui est probablement due aux conditions culturales ou atmosphériques.

En valeur relative (par rapport aux témoins sains), l'activité PPO suit une courbe régulière dont le maximum se trouve à 60 jours pour les racines brunes. Pour les racines liégeuses, l'activité PPO diminue régulièrement du 60ème jusqu'au 105ème jour pour s'aligner ensuite avec celle des témoins sains.

2) Activité AO :

Les résultats de cette activité enzymatique au cours du développement de la maladie figurent dans le tableau XVIII.

Temps en jours	Racines saines = Témoin	Racines brunes		Racines liégeuses	
		ul d'O ₂	en % de T	ul d'O ₂	en % de T
45	8,8	25,2	286	-	-
60	7,8	14,7	188	17,9	229
75	7,1	14,6	205	13,1	181
90	5,1	13,5	264	13,5	264
105	3	9,6	320	14,9	496

Tableau XVIII.

Consommation d'O₂ en ul/g/mn par 0,5 ml d'acide ascorbique (0,12 M) en présence de 2 ml d'extrait de racines (pH = 6,7) après incubation de 60 mn.

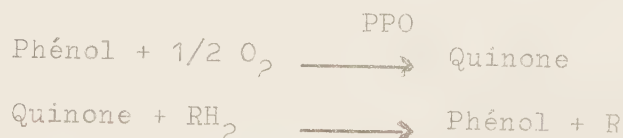
.../...

Il est intéressant de constater que cette activité est élevée dans les racines brunes et liégeuses, puisqu'elle augmente de 100 à 400 % par rapport aux témoins sains.

3) Présence de corps réducteurs (RH_2) :

Le catéchol, membre le plus simple de la série des polyphénols, est choisi comme substrat pour étudier la présence éventuelle de corps réducteurs (comme l'acide ascorbique) dans les racines de tomate.

KERTESZ et AZZOPARDI (1960) ont montré que la PPO est incapable de catalyser seule l'oxydation de substances réductrices tel que l'acide ascorbique. Par contre, la possibilité d'une interaction entre le système Enzyme-Phénol d'une part et substance réductrice d'autre part, permet le retour au phénol par oxydation du réducteur. HESS (1958) a donné le schéma suivant.



Pour la commodité de l'exposé, nous appellerons A, l'extrait enzymatique des racines saines, B celui des racines brunes et C celui des racines liégeuses.

Les résultats obtenus (Fig V) montrent que :

- La consommation d' O_2 pour les trois extraits, est bien plus importante pendant la première heure d'incubation que pendant les deux suivantes, ce qui montre l'existence de corps réducteurs (HESS 1958). Cependant, la différence de consommation pendant la première heure et la seconde est plus importante en présence de B

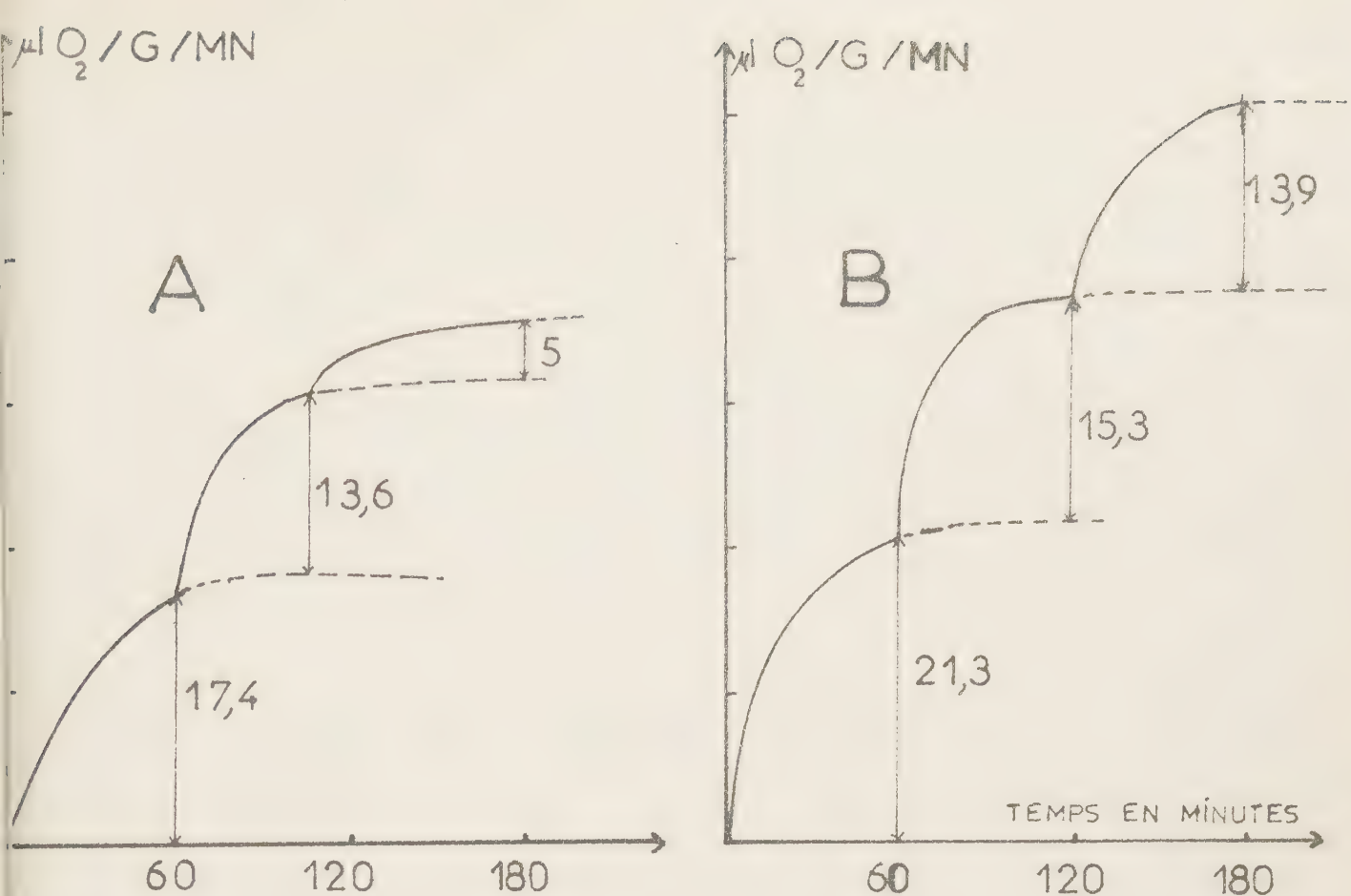
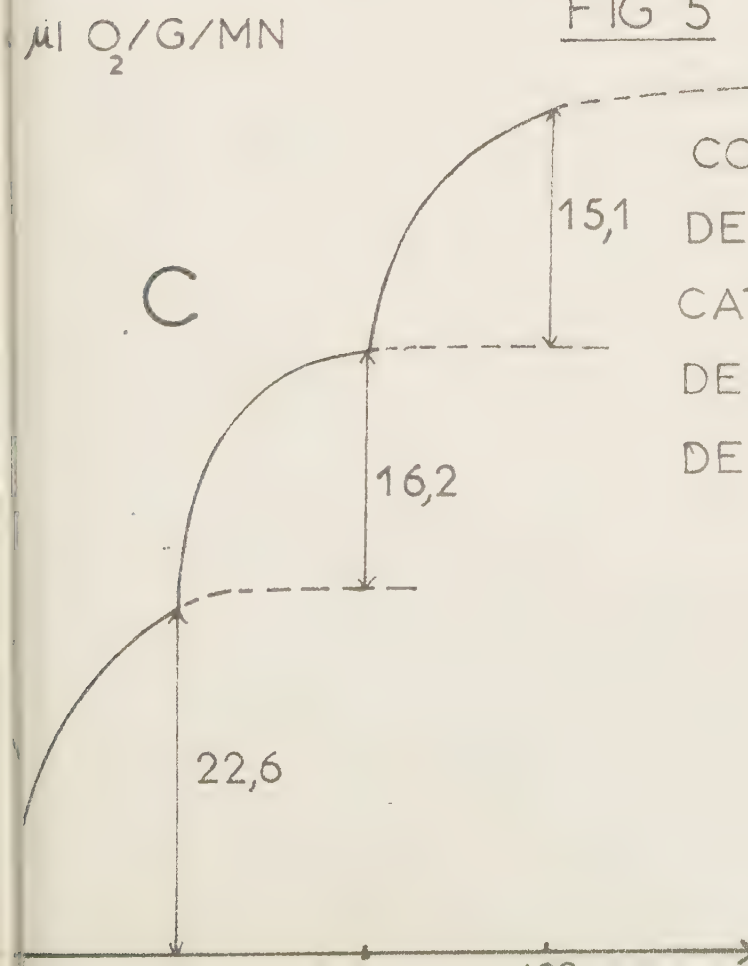


FIG 5



CONSOMMATION D'O₂ RESULTANT
DE L'OXYDATION DE 0,2ml DE
CATECHOL EN PRESENCE
DE 2ml D'EXTRAIT ENZYMATIQUE
DE RACINES

A ; SAINES

B ; BRUNES

C ; LIEGEUSES

(différence de 6 ul/g/mn) et C (6,4 ul/g/mn) qu'en présence de A (3,8 ul/g/mn. Ceci est dû à la présence d'accepteurs d'O₂ dont le taux est plus important dans les racines nécrosées que dans les racines saines.

- La consommation d'O₂ enregistrée pendant la première heure en présence d'extrait de A est du même ordre de grandeur que celle enregistrée pendant la deuxième heure en présence de B et C, ce qui semble dire que les chiffres obtenus pour B et C pendant la deuxième heure et pour A pendant la première traduisent l'activité PPO.

- L'Enzyme n'est pas rapidement inactivée par les produits d'oxydation des phénols (WILLIAMS 1963). En effet, nous ne constatons une inhibition de l'activité PPO que pendant la troisième heure pour A, par contre, l'activité des extraits enzymatiques B et de C demeure encore importante, ce qui confirme que l'activité PPO est nettement supérieure dans les racines attaquées.

4) Influence de l'acide ascorbique sur l'oxydation du catéchol :

Les résultats figurent dans le tableau XIX.

.../...

Concentration de l'acide ascorbique (mM)		Consommation d'O ₂ (ml/g/mn)		Oxydation du substrat
0	10	0	10	
0	0	0	0	-
0,1	0,2	0	0	-
0,2	0,4	0	0	-
0,4	0,8	0	0	-
0,8	1,6	0	0	-
1,6	3,2	0	0	-

Tableau XIX

Consommation d'O₂ en ml/g/mn par 0,5 ml de catéchoï (0,01 M) en présence de différents taux d'acide ascorbique et 2 ml d'extrait de racines brunes de 60 jours. pH = 6,7 incubation : 60 mn.

KEPTECZ et AZZOPARDI (1966) ont observé également que plus le taux d'acide ascorbique est important, plus la consommation d'O₂ est forte et moindre est l'oxydation du substrat.

5) Spécificité de la PPO :

Plusieurs auteurs ont montré que la spécificité des PPO dépend de leurs origines (LAVOLLA et coll 1963). Le catéchoï a souvent été utilisé comme substrat pour déterminer l'activité PPO, mais

.../...

ce phénol n'est pas toujours le plus facilement oxydable.

Ainsi, si la PPO du tabac oxyde le catéchol plus rapidement que l'acide chlorogénique et l'acide caféique (HESS 1958), celle des pommes de terre a plus d'affinité pour l'acide chlorogénique (EIGER et DAWSON 1949). PALMER a montré que la 3 - hydroxytyramine (Dopamine) est le meilleur substrat pour la PPO des bananes.

Il nous semble donc important de connaître l'activité des extraits de racines attaquées sur les principaux phénols responsables du brunissement et de la formation du suber.

Nous avons choisi ceux qui interviennent dans la subérisation des tubercules de pomme de terre (SIMMONDS et coll 1953; JOHNSON et SCHAAAL 1952) car nous n'avons pas pu trouver dans la littérature la composition en phénols totaux des plantes de tomate. WAGGONER et DIMOND (1956) ont réussi à isoler l'acide chlorogénique des feuilles de tomate, mais non des tiges et des racines.

Ces phénols sont des ortho-diphénols : catéchol, acide caféique, acide chlorogénique, acide protocatéchique. A titre comparatif, nous avons inclus dans notre choix deux monophénols : la tyrosine et le para-cresol, et un para-diphénol : l'hydroquinone.

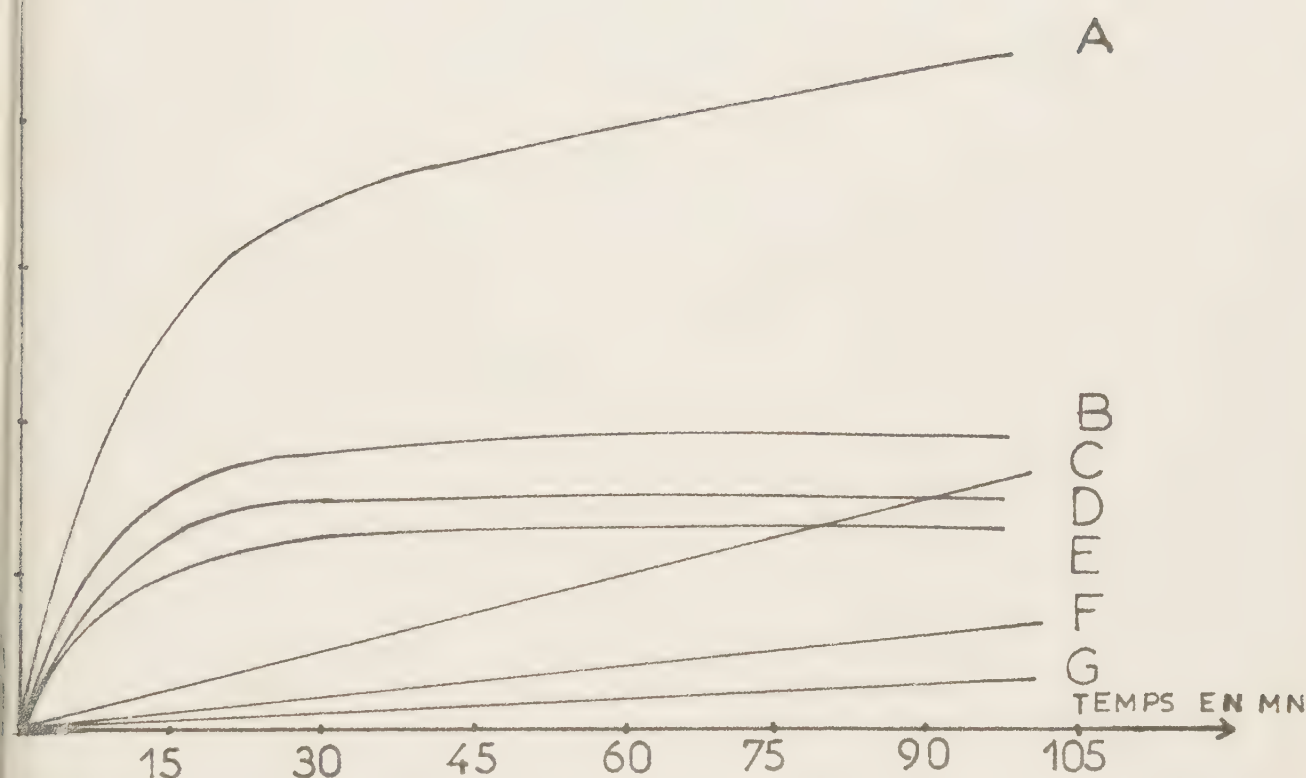
Nous ne ferons aucune distinction entre activité tyrosinase (catécholase et crésolase) et laccase dont les définitions sont encore obscures (FLING et coll 1963, JOLLEY et MASSON 1965). Aussi continuerons-nous à appeler la ou les enzymes présentes dans l'extrait de racines : Polyphénol oxydase (PPO).

La Fig VI montre que la PPO des racines de tomate a une certaine spécificité. Le P. crésol, le catéchol, l'acide chlorogénique et l'acide caféique sont rapidement oxydés. Le plateau est

.../...

FIG 6

$\mu\text{O}_2/\text{G}/\text{MN}$



CONSOMMATION D' O_2 PAR 0,5ml DE SUBSTRAT
(0,01M) EN PRESENCE DE 2ml D'EXTRAÎT
ENZYMATIQUE DE RACINES BRUNES DE 60j

B : CATECHOL

A : p.CRESOL

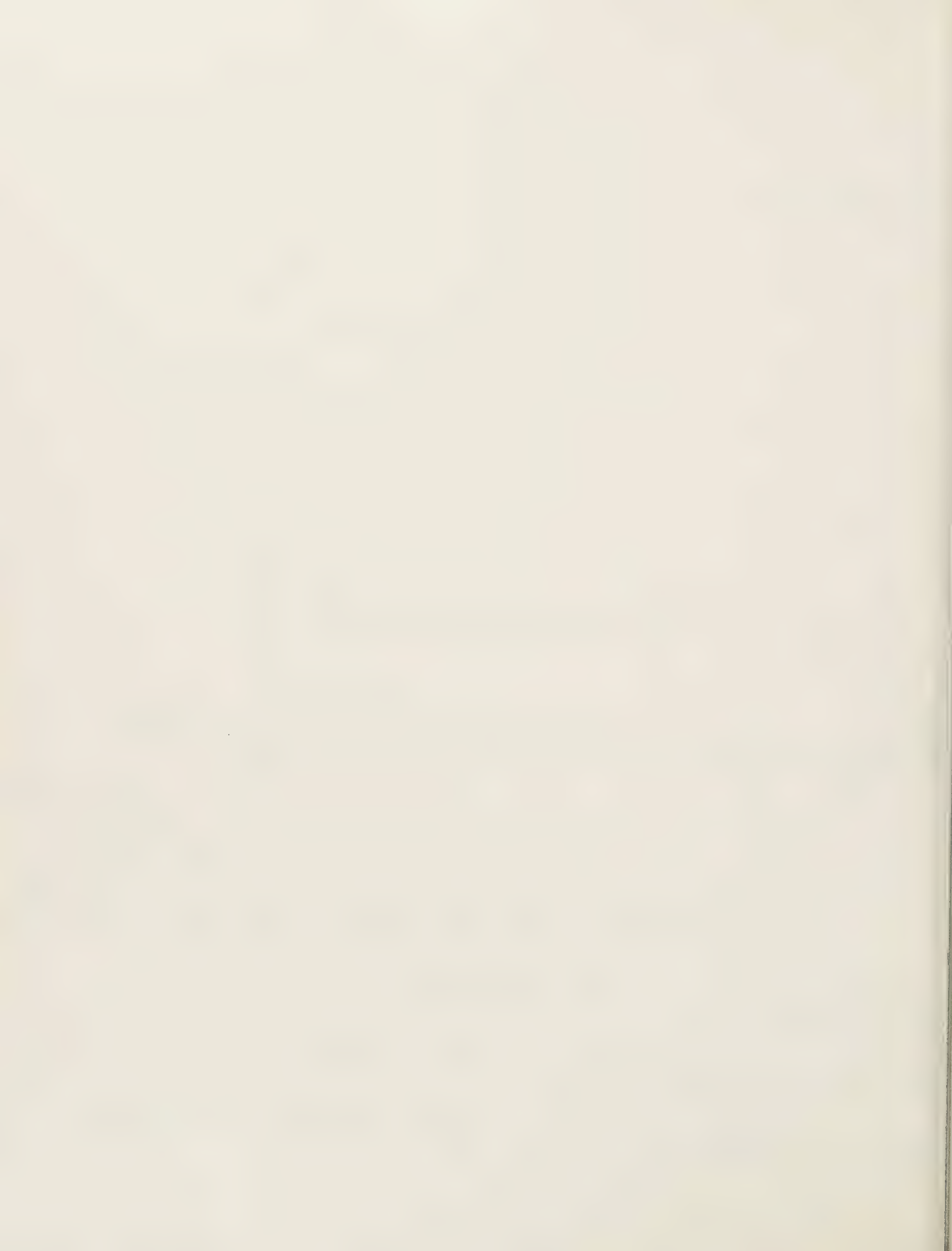
C : TYROSINE

D : A.CHLOROGENIQUE

E : A.CAFÉIQUE

F : HYDROQUINONE

G : A.PROTOCATECHIQUE



atteint en 15 mn par épuisement du substrat et non par inactivation enzymatique puisque nous avons montré que l'extrait enzymatique reste actif au-delà de 2 heures (cf Fig V). Par contre, l'oxydation de la tyrosine, de l'hydroquinone et de l'acide protocatéchique est linéaire et se poursuit au delà de 90 mn. Quoique lente, cette oxydation est enzymatique puisque d'une part, il y a coloration du milieu d'incubation, d'autre part, la consommation d'O₂ par ces trois phénols en présence de l'extrait enzymatique, est supérieure à leur autooxydation (cf tableau XXII).

WAGGONER et DIMOND (1965) ont montré que la PPO des tiges de tomate a une faible activité sur les monophénols. La PPO présente dans les extraits de racines agit sur tous les phénols étudiés. Son activité dépend de la structure du phénol et non pas du nombre de groupements hydroxyls.

L'oxydation des phénols s'accompagne plus ou moins rapidement par l'apparition d'une coloration du milieu d'incubation comme le montre le tableau XX.

nombre et position des -OH	substrat	couleur
1	P. Crésol Tyrosine	rougeâtre rouge violacée
2 en ortho.	Catéchol Acide chlorogénique Acide caféique Acide protocatéchique	brun rougeâtre brun verdâtre jaune orangée jaunâtre
2 en para	Hydroquinone	rougeâtre

Tableau XX.

Coloration des extraits de racines (pH = 6,7) en présence de différents phénols après incubation de 90 mn. $t = 26^{\circ}$.

II - Conclusion et discussion

Les principales conclusions que nous pouvons tirer de notre étude enzymatique sont les suivantes :

a) Les activités PPO et AO sont nettement plus élevées dans les racines attaquées que dans les racines saines. Leurs activités maximales coïncident avec la plus forte consommation d'O₂ par les tissus attaqués, donc avec le plein développement de la maladie (cf Fig VII).

b) Les ortho-diphénols entrant généralement dans les phénomènes de brunissement et de subérisation sont rapidement oxydés (cf Fig VI).

..../...

c) L'oxydation du substrat, donc sa coloration diminue avec l'augmentation du taux en acide ascorbique (cf tableau XIX).

d) Les extraits de racines attaquées de 60 jours révèlent la présence de corps réducteurs en quantité plus importante que dans ceux des racines saines (cf Fig V).

Quelle signification peut-on donner à ces résultats ?

Plusieurs auteurs ont étudié et démontré le rôle des phénols et des phénolases dans les phénomènes de brunissement, de subérisation et de lignification.

SHIROYA et HATTORI (1955) ont observé la disparition des acides chlorogénique et caféique des feuilles brunissantes de dahlia (Dahlia variabilis).

HATTORI et SHIROYA (1955) ont montré que la DOPA est responsable du brunissement et du noircissement des différents tissus de Stizolobium hassjoo.

JOHNSON et SCHALL (1952) ont montré que les orthophénols, sous l'action de tyrosinase, stimulent la production de suber.

Par des expériences d'inhibitions artificielles des processus d'oxydation des phénols, CUNNINGHAM (1953) empêche la formation de barrières liégeuses par les tubercules de pomme de terre attaquées par Fusarium.

HERGERT et KURTH (1952), HERGERT (1958) ont trouvé une large proportion d'acides phénoliques dans les produits de saponification

du liège.

Nous savons que dans les phénomènes de lignification, les PPO sont responsables de la conversion des monophénols (acide cinnamique) en diphénols (acide caféique).

Nous avons montré que l'oxydation du catéchol est entravée par la présence de corps réducteurs comme l'acide ascorbique (cf tableau XIX) et que les tissus nécrosés sont plus riches que les tissus sains en corps réducteurs.

HATTORI et SHIROYA (1959) ont observé un brunissement plus important dans les jeunes feuilles de Stizolobium hasjoo que dans les feuilles adultes, car dans ces dernières, le taux d'acide ascorbique est bien plus important.

SOLYMOSY et coll (1959), BLOSS et GRIES (1967) ont montré que l'acide ascorbique retarde l'oxydation des phénols en quinones, donc leur polymérisation en substances colorées.

Nous n'avons pas dosé l'acide ascorbique des tissus attaqués et des tissus sains. Cependant, l'augmentation de l'activité ascorbique oxydase au cours du développement des symptômes (cf Fig VII), et la présence d'un taux de corps réducteurs plus important dans les tissus attaqués semblent indiquer que l'ascorbique oxydase n'influe pas sur les phénomènes de brunissement.

La Fig VII montre que la variation de l'activité PPO au cours du développement de la plante suit généralement la courbe de la respiration des tissus attaqués. A 45 jours, l'activité PPO des racines brunes est légèrement supérieure à celle des racines saines et ne devient maximale qu'au 60ème jour, c'est-à-dire en même temps que

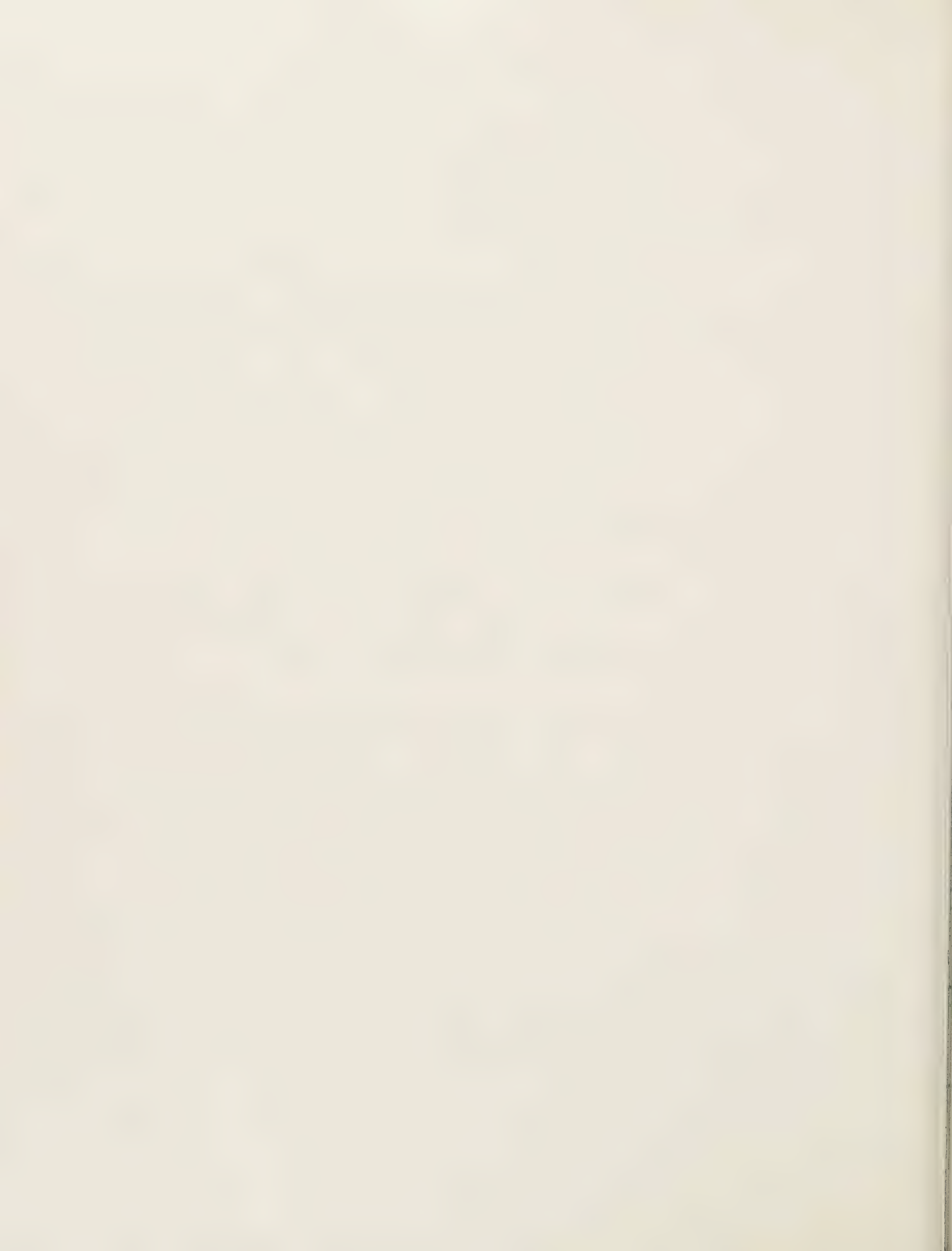
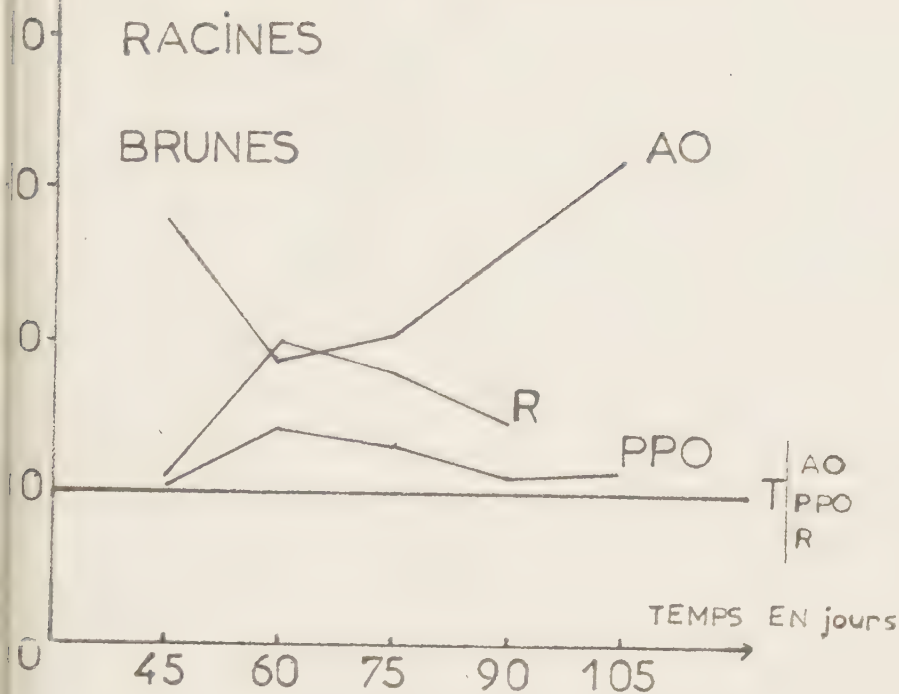
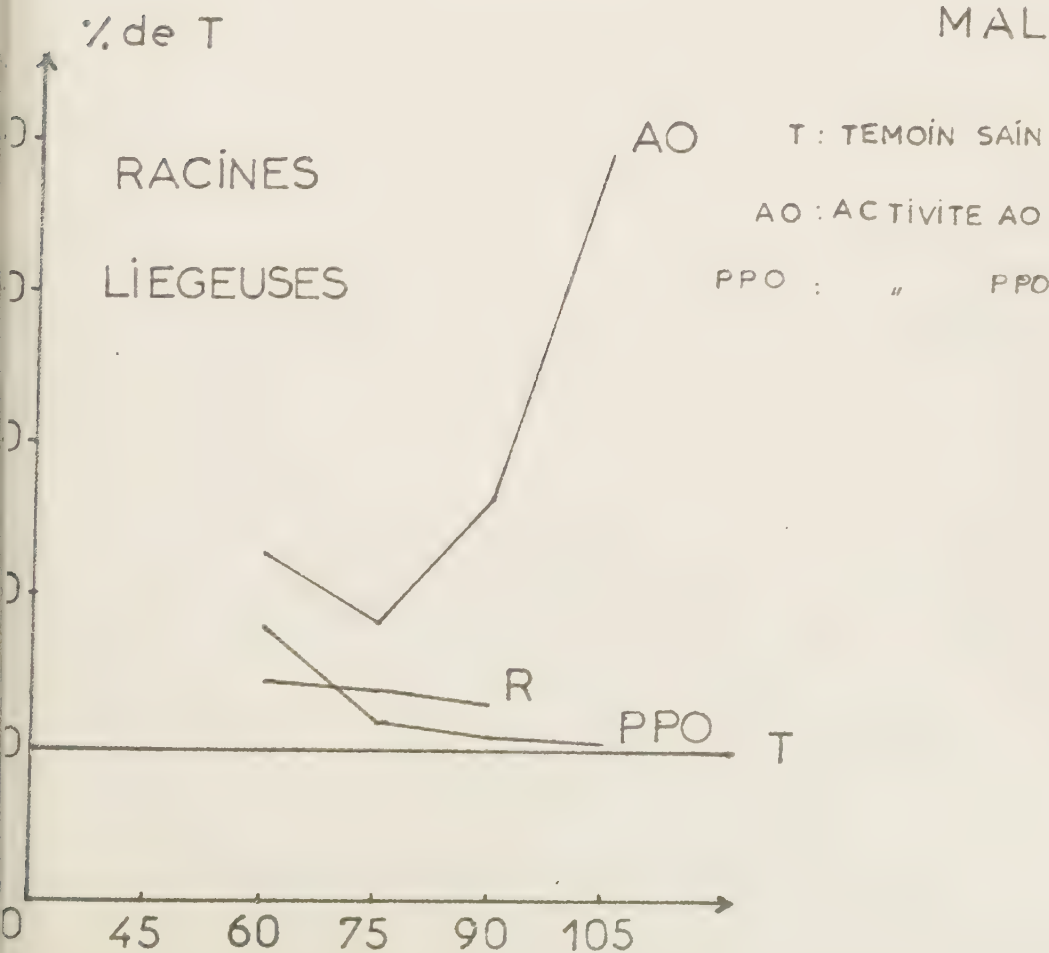


FIG 7



RESPIRATION ET
ACTIVITES PPO ET AO
AU COURS DU DEVE-
LOPPLEMENT DE LA
PLANTE ET DE LA
MALADIE.



le plein développement de la maladie. Nous ne pouvons cependant donner aucune explication à cette brusque activation malgré les nombreuses hypothèses qui ont été proposées sur l'activation ou la formation des PPO en général (FAHRAËUS 1952, 1953 ; KENTEN 1957, DEVERALL 1961). La réduction de l'activité PPO constatée après le 60ème jour aussi bien chez les racines brunes que chez les racines liégeuses peut provenir à la fois de l'inactivation de l'enzyme par les produits d'oxydation des phénols (cf Fig V) et de la réduction de la respiration, donc peut-être de leur synthèse.

C- Variations des activités PPO-AO et sensibilité variétale

D'après YARWOOD (1967), "la résistance est une règle plutôt qu'une exception". Ce principe implique que chaque plante a un ou plusieurs mécanismes pour résister à la plupart des microorganismes environnant, dont certains sont pathogènes pour d'autres espèces.

Nous nous intéresserons particulièrement aux relations pouvant exister entre activités PPO, AO et sensibilité variétale.

1) Résultats.

Les activités PPO et AO des différentes espèces et variétés de tomates sensibles, demi-résistantes et résistantes figurant dans le tableau XXI.

Activités Plantes	PPO		AO	
	Racines saines	Racines attaquées	Racines saines	Racines attaquées
<u>L. hirsutum</u>	13	21,7	41	34,6
<u>L. peruvianum</u>	27,5	70,1	26,2	33,4
Espalier	19	28,2	21,1	48,1
<u>L. esculentum</u>	23,5	58,2	18,6	50,9
Saint-Pierre	18	38,6	33,6	51,6

Tableau XXI.

Consommation d'oxygène en ul/g/mn par 0,5 ml de catéchol (0,01 M) ou d'acide ascorbique (0,12 M) en présence de 2 ml d'extrait enzymatique de racines.

2 ml d'extrait enzymatique de racines.

pH = 6,7 t = 26° incubation 60 mn.

Par racines attaquées de L. hirsutum, nous sous-entendons racines ayant poussé dans un sol infesté. Pour les autres espèces ou variétés, ce sont des racines présentant des symptômes de brunissement ou de liège.

.../...

Comme précédemment (cf tableaux XVII et XVIII), nous constatons que les activités PPO et AO sont nettement supérieures dans les racines attaquées que dans les racines saines. L'activité AO de L. hirsutum fait cependant exception.

II - Conclusion et discussion :

Nous avons montré dans notre étude sur la sensibilité variétale (cf Planche VI) que seules les variétés et espèces sensibles et tolérantes réagissent à l'attaque par la manifestation des symptômes. De même nous avons insisté sur les phénomènes de brunissement et de subérisation entraînant la mort de la cellule, sans pour autant entraîner celle du parasite.

Ce sont là des réactions qui définissent la sensibilité.

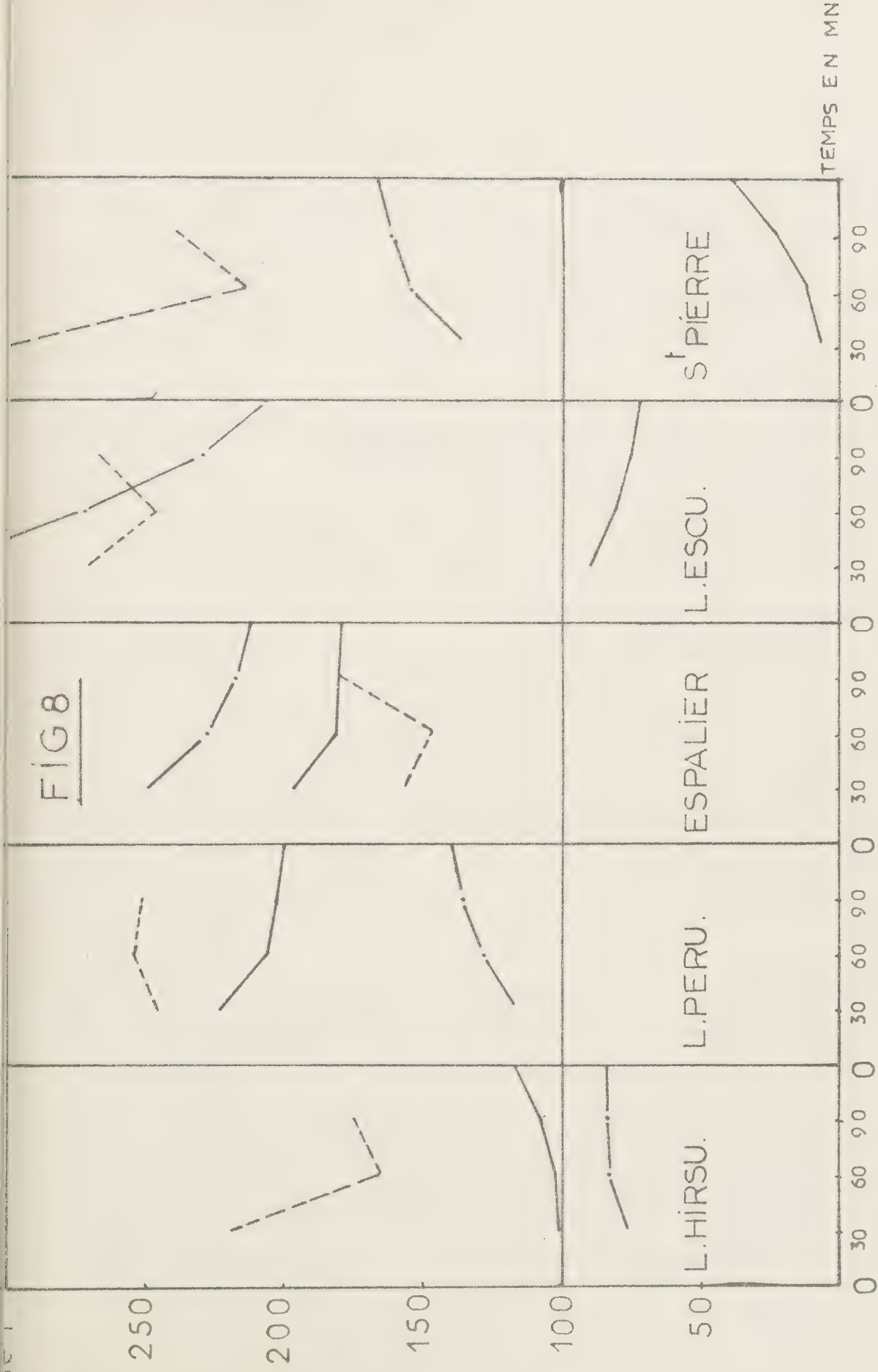
Le cas de L. hirsutum paraît être plus complexe. En effet, d'une part le système racinaire de cette espèce poussant en sol infesté ne présente aucun symptôme d'attaque (cf Planche VI), d'autre part, nous n'avons pas réussi à isoler le parasite des racines. Si cette espèce semble être immune, comment pouvons-nous alors expliquer cette forte augmentation dans l'activité PPO ?

RAUTELA et PAYNE (1970) ont observé une augmentation rapide de l'activité PPO dès le premier stade de l'infection des feuilles de betterave résistante à Cercospora beticola, et l'apparition de taches difficilement visibles. Cette augmentation de l'activité PPO s'atténue en quelques jours puis s'aligne avec la normale.

D'après nos résultats, nous ne pouvons donc que supposer l'existence d'un phénomène d'hypersensibilité quoique nous n'ayons aucun argument direct pour le prouver. Nous pensons que le champignon pénètre

.../...

FIG 8



RESPIRATION ACTIVITES AO ET PPO DE RACINES

DE 4 MOIS

TEMPS EN MN

dans les tissus comme l'a montré TERMOHLEN (1962). Ceux-ci réagissent à l'infection par une activation rapide des PPO qui pourraient convertir les composés phénoliques en une forme plus toxique pour le champignon. Les hyphes sont tuées ou arrêtées dans leur progression juste après leur entrée dans la cellule. Les nécroses se trouvent ainsi réduites à un nombre de cellules tellement faible que les taches sont invisibles.

La diminution de l'activité AO uniquement chez l'espèce résistante L. hirsutum pourrait être liée à la résistance de cette espèce. La faible activité AO pourrait en effet maintenir le pouvoir réducteur de la cellule élevé, retardant ainsi le brunissement, donc la mort de la cellule. Celle-ci pourrait donc libérer davantage de substances toxiques pour la parasite (Phytoalexines par exemple), ce qui conduirait à stopper sa progression. Cette hypothèse concorde avec nos résultats mais n'est nullement démontrée.

Pour les plantes sensibles et tolérantes (l'infection se fait bien plus tard pour ces dernières), la première étape de l'infection (pénétration, augmentation de l'activité PPO) est peut être identique à celle de L. hirsutum, mais des différences apparaissent rapidement : apparition des symptômes, augmentation de l'activité AO. Les nécroses s'agrandissent de plus en plus, et le parasite continue sa progression dans les tissus.

La Fig VII montre qu'à 4 mois, la respiration des racines de L. hirsutum est identique à celle des témoins. Or, la respiration est la source d'énergie indispensable à toutes les synthèses. Nous admettons donc l'existence d'un nouvel équilibre stable après l'infection chez L. hirsutum et instable chez les autres variétés sensibles et tolérantes puisque le développement de la maladie se traduit par une diminution de la respiration, donc par une dégénérescence des cellules.

TOLERANCE DE P. LYCOPERSICI AUX REACTIONS DE
DEFENSE DE LA PLANTE ET SA PARTICIPATION A LA
MANIFESTATION DES SYMPTOMES

L'augmentation de l'activité PPO dans les tissus infectés et les réactions de brunissement sont généralement en relation avec la production de substances toxiques pour le pathogène (FARKAS et KIRALY 1962). Cependant, malgré la présence de ces produits, le parasite continue à survivre dans les cellules brunes et les cellules subérifiées, et à s'étendre plus profondément dans les tissus de l'hôte.

Il nous semble donc intéressant d'étudier l'action de quelques phénols sur la croissance du champignon, d'essayer de mettre en évidence la production d'une PPO par le parasite, enfin, l'utilisation probable par le parasite de glucosides éventuels de la plante, glucosides dont la partie aglycone est un phénol.

Cette étude peut être sujette à plusieurs critiques. En effet, nous ignorons la nature des phénols de la plante de tomate, la nature de ceux participant à la formation des substances brunes présentes dans les cellules. De plus, nous étudions la production et l'activité PPO de P. lycopersici dans un milieu artificiel très différent de la cellule végétale.

Cependant, malgré ces nombreuses critiques, cette étude pourra peut être nous donner des renseignements utiles sur la tolérance de P. lycopersici aux réactions de défense de la plante et sa participation à la manifestation des symptômes.

A- Toxicité de quelques phénols:

Plusieurs auteurs ont attiré l'attention sur les relations

existant entre la présence de composés phénoliques dans les tissus et la résistance variétale. Les travaux ont généralement été orientés dans trois directions :

- Action inhibitrice in vitro de composés phénoliques sur le développement de microorganismes phytopathogènes (SHU-FUNG et LE TOURNEAU 1958, DIEM 1967).

- Action inhibitrice in vivo de composés phénoliques préexistant dans les tissus menacés par l'infection (NEWTON et ANDERSON 1929, FEHRMAN et DIMOND 1967).

- Action des composés phénoliques sur certaines enzymes extra-cellulaires du parasite (PATIL et DIMOND 1967, 1968, OKASHA et coll 1968, KUC 1968).

Nous nous intéresserons uniquement à l'action de quelques composés phénoliques sur la croissance mycelienne de P. lycopersici.

1) Résultats :

Les résultats de l'action des sept phénols testés sur la croissance du champignon sont représentés dans la figure IX. Les histogrammes dont l'extrémité est comprise dans la zone grisée (25) ne traduisent pas une action significative du traitement sur le champignon.

L'examen de cette figure indique que la souche utilisée tolère bien en milieu liquide, la présence des différents phénols. Nous constatons cependant que la catéchol est à la limite de la toxicité.

.../...

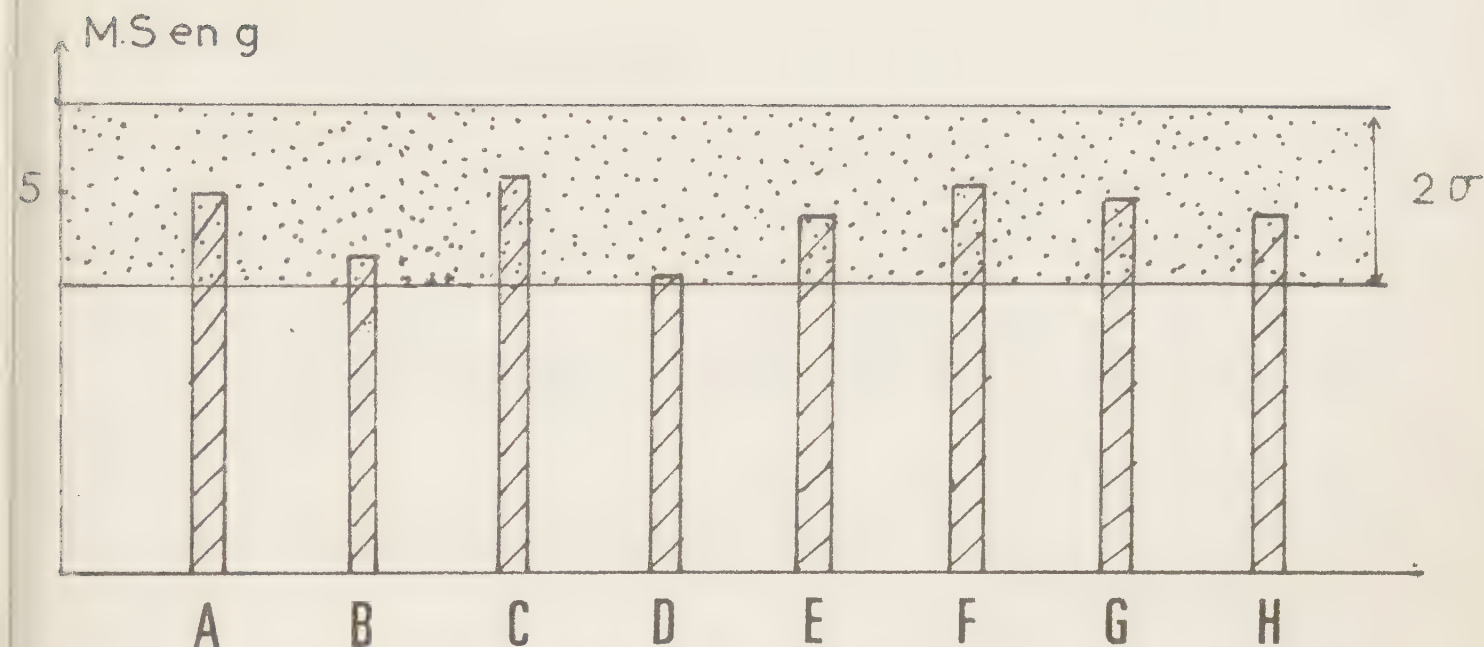


FIG 9

CROISSANCE MYCELIENNE DE *P.LYCOPERSICI*
 EN PRESENCE DE DIFFERENTS PHENOLS
 (0,01M)

A : TEMOIN

C : TYROSINE

E : A.CAFEIQUE

G : HYDROQUINONE

B : P.CRESOL

D : CATECHOL

F : A.PROTOCATECHIQUE

H : A.CHLOROGENIQUE

II - Conclusion et discussion .

Rappelons que la plupart des phénols choisis interviennent dans la subérisation des tubercules de pomme de terre (SIMONDS et coll 1953), qu'ils se sont révélés être toxiques in vitro pour plusieurs champignons parasites comme Verticillium albo-atrum (SHU-FUNG et le TOURNEAU 1958), Cochliobolus miyabeanus (OKU 1958), Phytophthora cryptogea (DIEM 1967).

Le rôle des composés phénoliques dans les mécanismes de résistance a été démontré par plusieurs auteurs.

WALKER (1923) ayant observé que les pignons à écailles rouges sont plus résistantes au Colletotrichum circinans que ceux à écailles blanches, LINK et coll (1929) ont pu rapporter cette résistance à la présence d'acide protocatéchique dans les tissus.

NEWTON et ANDERSON (1929) ont établi une relation entre la présence de composés phénoliques dans les feuilles de blé et leur résistance à Puccinia graminis. L'injection de catéchol ou de vanilline à des variétés sensibles augmente leur résistance.

JOHNSON et SCHAAL (1952) trouvent une bonne corrélation entre la résistance des pommes de terre à la gale commune due à Streptomyces scabiés et le taux d'acide chlorogénique présent dans les tissus.

GOTHOSKAR et coll (1955) injectent de la thiourée et du diethyl dithiocarbamate à des tomates résistantes à Fusarium. Ils observent une forte diminution de la résistance par inhibition des PPO.

SHU-FUNG et LE TOURNEAU (1958) trouvent un taux d'acide chlorogénique bien plus important dans les variétés de pomme de terre

résistantes à Verticillium.

OKASHA et coll (1968) ont observé une inhibition de la croissance végétative de Verticillium alboatrum par les polyphénols et tannins extraits des racines de fraisiers attaqués.

Nos expériences avec P. lycopersici ont montré que ce champignon est tolérant à l'action toxique des phénols étudiés. Cette tolérance pourrait expliquer sa longue survie dans les cellules nécrosées et sa progression vers les cellules adjacentes.

Nous pensons que cette tolérance au milieu défavorable qu'est la cellule atteinte de BRR ou subérifiée peut provenir d'une détoxification des phénols ou des quinones produites par leurs oxydations. C'est ce que nous allons essayer de démontrer dans notre prochain paragraphe.

B-Production d'une PPO par P. lycopersici

La sensibilité d'un microorganisme à un fongicide peut provenir de son aptitude à l'activer ou à l'inactiver. Si le composé est modifié, sa toxicité peut-être augmentée, diminuée ou reste inaltérée. Les substances altérant ces produits chimiques peuvent être induites ou constitutives (SISTLER et COX 1960).

Les quinones et les phénols peuvent être sujets à une détoxification par les champignons (SISTLER et COX 1960). RICH et HORSFALL (1954) ont montré que la PPO produite par Stemphylium sarcinaeforme permet l'oxydation et la polymérisation des phénols en produits colorés, les rendant ainsi inoffensifs.

Nous chercherons à mettre en évidence la présence d'une PPO dans les filtrats de culture et dans le mycelium de P. lycopersici,

sa spécificité vis à vis de quelques phénols testés.

I - Résultats :

1) Autooxydation des phénols :

L'autooxydation des phénols utilisés figure dans le tableau XXII.

Temps en mn		40	80	120	140
Phénol					
Mono-phénol	P. Cresol	1,8	2,3	4,8	7,8
	Tyrosine	0,8	1,8	4,8	6,1
Ortho-Di-phénol	Catéchol	5,5	8,4	10,9	13,8
	A. chlorogénique	5,7	8,2	11,5	12,4
	A. caféique	5,2	7,9	10,1	11,4
	A. Protocatéchique	2	2	4,2	6,1
P. diphénol	Hydroquinone	4,3	6,1	8,3	9,5

Tableau XXII.

Autooxydation des phénols (10^{-2} M) en ul O_2 .

t = 26° pH = 6,7.

.../...



HESS (1958) obtient pour l'acide caféique, l'acide chlorogénique et le catéchol des valeurs inférieures à celles figurant dans ce tableau. Mais cet auteur a travaillé dans des conditions différentes des nôtres, notamment le pH.

2) Activité PPO.

a) PPO intracellulaire.

La consommation d'oxygène obtenue en incubant l'extrait de mycelium avec différents phénols figure dans le tableau XXIII.

Temps en mn	40	60	100	140
Phénols				
P. Cresol	2,1	3,6	5,3	6,8
Tyrosine	1,2	3,4	4,7	6,1
Catéchol	4,3	8	12	16,4
A. chlorogénique	5	6,7	8,5	10,6
A. caféique	4,1	7	9	12,3
A. Protocatéchique	6,2	9,5	11,8	14,6
Hydroquinone	5,9	7,7	8,9	8,9

Tableau XXIII.

Consommation d'O₂ (en ul) par 0,5 ml de substrat (0,01 M) en présence de 2 ml d'extrait de mycelium.

pH = 6,7

T° = 26°.

En comparant ce tableau avec celui de l'autooxydation des phénols (cf tableau XXII) nous n'observons pratiquement pas de différence entre les valeurs obtenues. Le milieu d'incubation restant incolore après 140 mn, nous pouvons conclure que, dans nos conditions expérimentales, l'extrait de mycelium de P. lycopersici ne présente aucune activité PPO.

b) PPO diffusible :

Les résultats de la consommation d'O₂ par les différents substrats en présence de filtrat de culture brut, sont reportés sur la figure X.

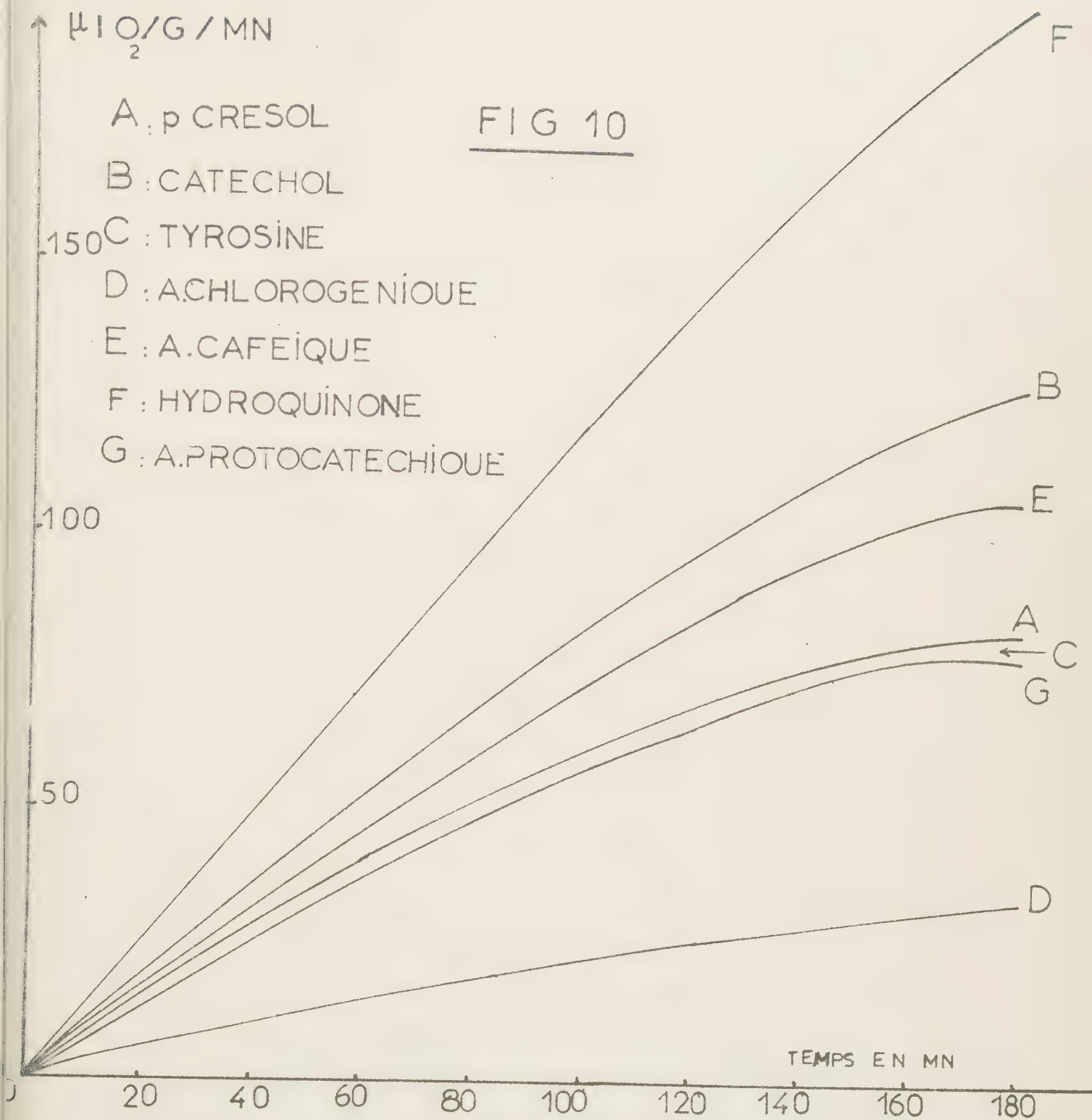
Nous avons pu déterminer une activité PPO uniquement dans le milieu de culture. Cependant, nous ne pouvons affirmer avec certitude qu'elle est extracellulaire. En effet, nous avons pris des cultures de 18 jours, c'est-à-dire des cultures en croissance maximale et même en début d'autolyse (cf Fig I).

La coloration du milieu après 60 mn d'incubation varie du jaune pâle au brun foncé. La consommation d'O₂ par les différents phénols est lente et moins brusque que celle que nous avons obtenue en présence des extraits de racines (cf Fig VI). Pour tous les phénols utilisés, le plateau ne commence à être atteint qu'après 160 mn d'incubation contre 15 mn pour les extraits enzymatiques de racines. La spécificité des deux PPO est différente (cf tableau XXIV). Le P. Cresol se révèle être le meilleur substrat pour la PPO de tomate, et l'hydroquinone pour celle du champignon. Il est à noter aussi que l'acide chlorogénique est le plus faiblement oxydé par P. lycopersici.

La comparaison entre la consommation d'O₂ par unité de poids de MS de racines et de mycelium figure dans le tableau XXIV.

Ce tableau montre, si nous faisons abstraction de la spécificité des deux PPO, que leurs activités par unité de poids sont

.../...



CONSOMMATION D'O₂ PAR 0,5ml DE SUBSTRAT
(0,01M) EN PRESENCE DE 2ml DE FILTRAT DE
CULTURE (18j) pH:6,7

presque identiques.

Phénols	Extrait de racines	Filtrat de culture
P. cresol	81,7	39,8
Tyrosine	20,7	39,5
Catéchol	38,7	59,9
A. chlorogénique	31,3	9,8
A. caféique	26,5	45,2
A. Protocatéchique	5,7	36,7
Hydroquinone	8,7	65,7

Tableau XXIV.

Consommation d' O_2 en ul/g/mn par 0,5 ml de phénol en présence de 2 ml d'extrait de racines ou de filtrat de culture.

pH = 6,7 t° = 26° incubation : 60 mn.

Nous ne pouvons cependant pas préciser les rôles de chacune des deux PPO dans l'oxydation des polyphénols de la plante, car nous ignorons d'une part, la quantité de mycelium présente dans les tissus, d'autre part, la composition en phénols de la plante.

II - Conclusion et discussion :

Dans nos conditions expérimentales, P. lycopersici produit une PPO diffusible, dont la spécificité est différente de celle des extraits enzymatiques des racines de tomate.

L'absence d'une activité PPO dans les extraits de mycelium peut être interprétée de trois façons :

- L'enzyme, sous forme active, est libérée dans le milieu extérieur par le début de l'autolyse mycelienne.

- L'enzyme est présente dans le mycelium, mais sous une forme latente (préphénolase) ou inhibée. KENTEN (1957, 1958), ROBB et coll (1964) ont montré que la phénolase masquée des extraits de feuilles de haricot ne devient active qu'après certains traitements.

- L'enzyme est présente dans le mycelium sous forme active, mais elle est si rapidement inactivée que les phénols ne sont pas oxydés. INGRAHAM (1955) observe l'inactivation de différentes PPO en 20 mn et FLING et coll (1963) celle de la tyrosinase de Neurospora crassa en 2 mn.

La PPO extracellulaire de P. lycopersici est active aussi bien sur les monophénols que sur les diphénols. Sa spécificité est différente de celle des racines de tomate. FLING et coll (1963), JOLLEY et MASON (1965) expliquent cette multiplicité dans l'action des différentes PPO étudiées par :

- Différents degrés de polymérisation de sous unités, les unes à prédominance activité crésolase, les autres à prédominance activité catécholase.

- Combinaisons différentes de ces sous unités.

- Changement dans la conformation d'une seule protéine.
- Combinaison de ces trois possibilités.

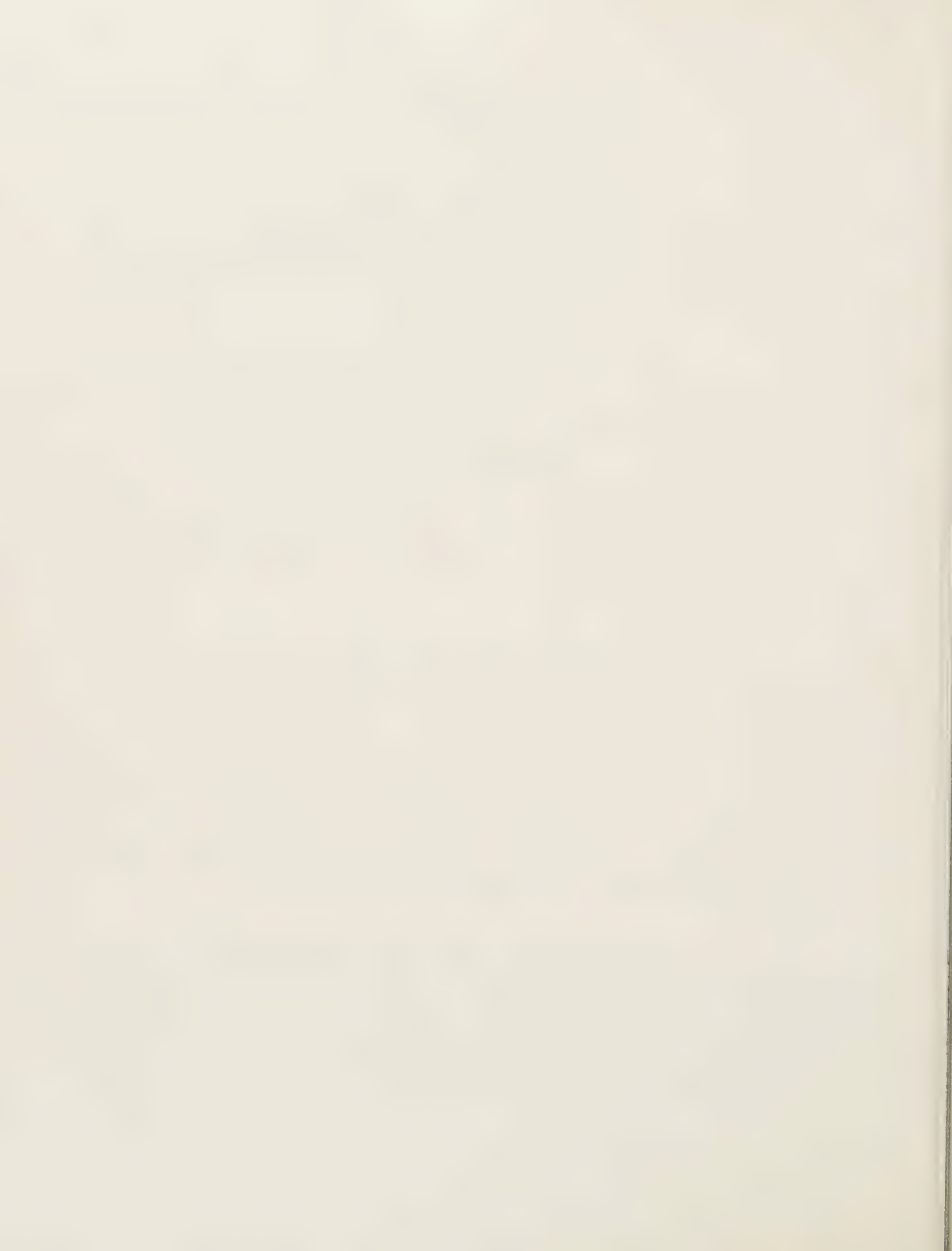
Après avoir donné une interprétation de la spécificité de l'enzyme et de l'absence d'activité PPO de l'extrait mycelien, nous pouvons nous demander quels rôles possède cette PPO au sein de la cellule.

RICH et HORSFALL (1954) ont démontré que tout champignon capable d'oxyder et de condenser les composés phénoliques en produits colorés, est généralement tolérant à l'égard de ces composés. La PPO produite par P. lycopersici pourrait donc détoxifier les phénols de la plante les rendant ainsi inoffensifs. Nous avons en effet démontré que les monophénols et diphénols testés n'ont pas d'action inhibitrice sur la croissance végétative du parasite (cf Fig IX), et qu'ils sont tous oxydés en présence du filtrat de culture (cf Fig X).

Or, la formation de produits bruns dans le milieu de culture suggère la participation du champignon à la manifestation des symptômes comme l'ont montré certains auteurs pour d'autres maladies (FARKAS et LEDINGHAM 1959 , OKU 1960). Nous ignorons cependant l'importance relative d'une part de l'activité PPO du parasite, d'autre part de celle de l'hôte. Il est à penser cependant que leur spécificité différente (cf Fig VI et X) implique un plus grand spectre d'action, permettant de donner ainsi à la maladie des racines liées de tomate ses symptômes caractéristiques.

Il est probable aussi que P. lycopersici est capable de participer à la manifestation des symptômes par la libération des phénols de la plante. Ce phénomène impliquerait alors la participation d'une autre enzyme, enzyme que nous allons essayer de mettre en évidence dans le dernier paragraphe de notre travail.

.../...



C- Production d'une β glucosidase par *P.lycopersici*

Il est actuellement admis que les composés phénoliques peuvent être présents dans les tissus sous forme libre ou sous forme liée (FARKAS et KIRALY 1962). Dans les tissus attaqués, la dégradation des glucosides par exemple peut se faire sous l'action de B. glucosidase secrétée par les microorganismes, libérant les composés phénoliques (DAVIS et coll 1953, WAGGONER et DIMOND 1956, HILDEBRAND et SCHROTH 1964 , JOUBERT et coll 1970) et participant ainsi à la manifestation des symptômes.

I - Résultats :

L'influence de différentes concentrations de saccharose, de salicine, d'arbutine et d'acide tannique sur la croissance mycelienne de *P. lycopersici* en milieu liquide et sur l'oxydation des filtrats de culture figure dans le tableau XXV.

Les chiffres figurant dans ce tableau montrent que *P. lycopersici* est capable d'utiliser des glucosides comme source de carbone, et que cette utilisation se traduit par une croissance végétative et une oxydation du milieu de culture plus ou moins importantes.

A une concentration de 0,3 %, la croissance du champignon est aussi importante en présence de saccharose, de salicine ou d'arbutine. Elle est inhibée lorsque la concentration des glucosides est de 2 %, le milieu devenant toxique par accumulation des phénols libérés.

L'oxydation du milieu de culture en présence des deux glucosides et de l'acide tannique est d'autant plus forte qu'il est moins



concentré et la croissance mycelienne plus importante. Ce résultat montre qu'il existe une relation étroite entre croissance mycelienne, production de B. glucosidase et oxydation par la PPO du champignon des phénols libérés.

Source de C	Concentration en %	Croissance en mg	Oxydation filtrat
Saccharose	0,3	115,4	0
	2	480	0
Salicine	0,3	82,9	2
	2	33	1
Arbutine	0,3	80	6
	2	46,1	3
Acide tannique	0,3	41,4	5
	2	0	4

Tableau XXV.

Croissance mycelienne en milieu liquide après incubation de 15 jours à la t° de 26°, en présence de différentes sources de carbone.

0 : couleur jaune pâle (milieu Czapek Dox) 6 : milieu noirâtre.

.../...

II - Conclusion et discussion :

Le rôle des glucosides dans les phénomènes de résistance a été démontré par plusieurs auteurs (HILDEBRAND et SCHROTH 1964; POWELL et HILDEBRAND 1970). La capacité de P. lycopersici à hydrolyser ces substances est compensée par sa tolérance à l'action antibiotique des phénols libérés. Ceux-ci sont oxydés d'une part par la PPO du champignon, d'autre part par celle de la plante, en donnant des produits colorés.

Des phénomènes semblables sont connus pour d'autres maladies. Ainsi, DAVIS et coll (1953) ont montré que le brunissement des tissus vasculaires des plantes de tomate est dû à l'oxydation des phénols, libérés par la B. glucosidase de F. oxysporum, et oxydés uniquement par la PPO de la plante.

Une réaction de brunissement peut être cependant obtenue en plaçant des fragments de racines saines dans l'eau distillée. (DAVIS et coll 1953). Les facteurs intervenant dans les phénomènes de brunissement sont donc tous rassemblés dans les tissus blessés. Cependant, le stade final des symptômes, c'est à dire la subérisation des parois cellulaires, ne se produit qu'en présence du parasite, et ceci indépendamment de l'âge de la plante. La B. glucosidase produite pourrait libérer certains phénols entrant dans la composition du suber, et qui ne pourraient l'être qu'en présence du champignon. Une étude approfondie des phénols présents dans les racines saines, brunes et liégeuses pourrait confirmer cette hypothèse.

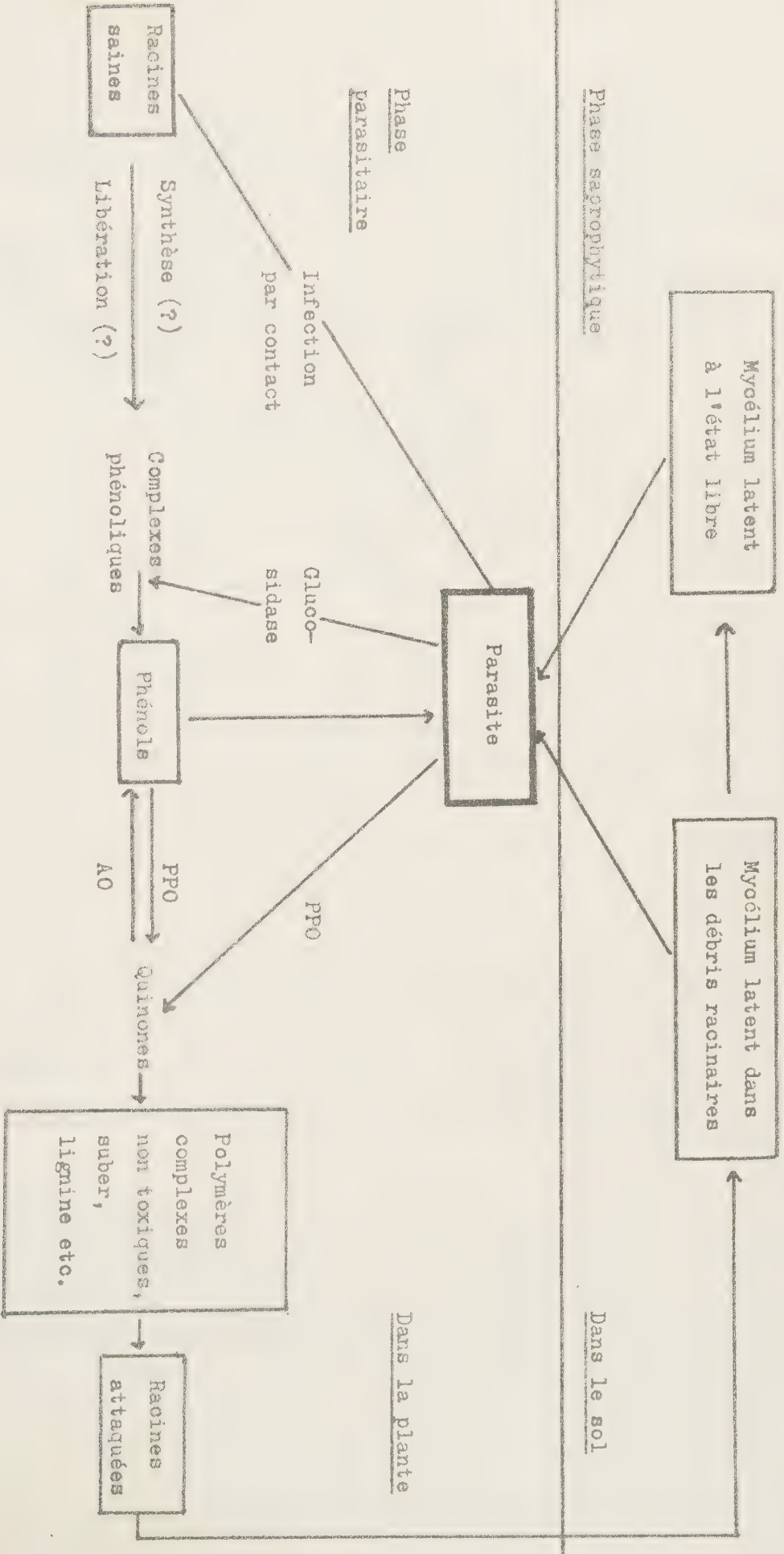


Schéma simplifié de quelques relations

Note (Tomate sensible) - Parasite (P. lycopersici).

CONCLUSIONS GENERALES ET ORIENTATIONS FUTURES.

=====

A- Conclusions générales

Nos recherches sur "la maladie des racines liégeuses de tomate" dûe à P. lycopersici ont essentiellement porté sur :

- La conservation du parasite dans le sol.
- L'infection et la colonisation de la plante.
- L'altération de la respiration des tissus attaqués.
- Les variations des activités PPO et AO au cours de la manifestation des symptômes.
- Les variations des activités PPO, AO et sensibilité variétale.
- La tolérance du parasite aux réactions de défense de la plante et sa participation dans la manifestation des symptômes.

Nous avons reporté sur le schéma précédent quelques interactions hôte-parasite.

P. lycopersici est un "root inhabiting fungus". Il est dépourvu de toute aptitude à la colonisation saprophytique contrairement à d'autres parasites des racines de tomates comme F. oxysporum et C. coccodés. L'augmentation du taux d'inoculum dépend uniquement de l'importance de l'attaque de la plante hôte, et non d'une multiplication végétative dans le sol.

Le champignon survit dans le sol sous forme de mycelium libre ou dans les débris racinaires. Il est difficile de préciser s'il est à l'état dormant (activité inhérente) ou à l'état latent (inactivité imposée par un environnement défavorable) quoique nous l'ayons isolé à partir

isolé à partir de cultures intermédiaires comme le melon et la laitue. Son état de dormance pourrait en effet être rompu par la présence de l'hôte. Aussi, ne ferons-nous aucune distinction entre état de latence et état de dormance et nous dirons qu'il est en état de vie ralentie. Les sclérotés observés par certains auteurs dans les cellules attaquées ne sont en fait qu'une condensation d'hyphes, condensation qui augmente cependant la durée de survie du parasite.

D'une culture à l'autre, P. lycopersici persiste dans le sol avec une perte de viabilité relativement faible. Ceci pourrait s'expliquer d'une part par son état d'inactivité, d'autre part par la présence, barrières de suber et de lignine dans lesquelles il est enfermé et qui le mettent à l'abri de la microflore antagoniste du sol.

A l'égard de cette microflore, P. lycopersici se comporte comme un véritable "root inhabiting fungus". Nos expériences de confrontation avec différents champignons (C. coccodés, F. oxysporum, Alternia sp., Chaetomium sp.), ont montré qu'il est sensible à l'action antibiotique de certains microorganismes du sol comme F. oxysporum, champignon qui est largement répandu dans les sols de serre. Cette action antibiotique est peut-être l'un des facteurs responsables de l'inactivité du champignon dans le sol et en l'absence de son hôte.

La tomate étant une culture qui revient tous les ans en serre, l'augmentation du taux d'inoculum dans le sol peut être l'une des causes de "la maladie des sols" (soil-sickness). Celle-ci pose un grave problème économique. En effet, lorsque la culture de tomate devient impossible par la baisse de rendement, il est impensable, dans les régions lorraines, de déplacer les serres ou d'en changer la terre, quoique cette solution extrême ait été adoptée par certains maraîchers en Hollande.

.../...

L'incapacité à pousser dans le sol, la grande sensibilité à l'égard de la microflore tellurique font que P. lycopersici ne peut infecter son hôte que lorsqu'il se trouve en contact direct avec ce dernier. La stimulation des champignons se conservant sous forme mycelienne étant en général plus rapide que celle se conservant sous forme d'autres organes, l'installation du parasite dans les cellules corticales a lieu pendant la première quinzaine suivant le repiquage des plantules, bien avant tous les autres microorganismes.

Les solanacées étudiées par l'équipe hollandaise se sont toutes montrées sensibles. Le champignon a été isolé à partir de familles très diverses. Il nous semble donc que la stimulation de l'activité par les exsudats racinaires est spécifique puisqu'elle est toujours suivie par une infection. Aussi, la stimulation de cette prolifération par l'emploi de plantes pièges peut être envisagée. On peut en effet espérer trouver une plante immune mais capable d'induire l'entrée en activité du mycelium de conservation.

Dans la plante, la progression du parasite est très lente, puisque l'attaque reste limitée à l'horizon de sol infesté, d'où l'importance de la stérilisation superficielle du sol. Les cellules répondent rapidement à l'infection par un brunissement caractéristique (BRR) et ensuite par un dépôt de lignine et de subérine sur les parois cellulaires, donnant aux racines leur aspect liégeux (Corky root).

Le passage d'une cellule attaquée vers les cellules saines se fait avant subérisation totale des parois cellulaires. Il y aurait ainsi une réaction en chaîne : invasion d'une cellule saine, brunissement rapide, invasion d'une autre cellule avant subérisation complète etc...

L'épaississement des parois cellulaires constitue un mécanisme de défense, mais dont la mise en action est d'abord assez lente pour

.../...

ne pas empêcher la progression du parasite, puis serait susceptible de s'accélérer et de conduire à une barrière liégeuse efficace. Ceci concorde avec la faible progression du parasite le long et dans les racines, et avec la limitation de l'attaque aux premières couches de cellules du Cortex des racines âgées.

Au stade plantule (12 jours), la sensibilité de huit variétés cultivées de tomate à C. coccodés, F. oxysporum et P. lycopersici est très différente. Aussi, toutes les variétés sont sensibles à P. lycopersici, deux sont sensibles à la fois aux trois parasites et aucune n'est résistante à la fois à C. coccodés et à F. oxysporum. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de résistance mis en oeuvre par ces différentes variétés à l'infection par les trois pathogènes sont différents.

Les espèces et variétés de Lycopersicum étudiées réagissent différemment à P. lycopersici. Toutes les variétés cultivées sont sensibles aussi bien au stade plantule qu'au stade plante. Certaines espèces et variétés sauvages (L. peruvianum, Espalier) doivent leur tolérance à leur résistance au stade plantule, tandis que d'autres (L. hirsutum) restent résistantes tout au long de leur développement végétatif. L'absence de symptômes chez cette dernière espèce montre que la formation de barrière liégeuse est un symptôme et non un mécanisme de résistance.

Comme pour la plupart des maladies, l'infection des racines de tomates par P. lycopersici est suivie par une forte perturbation dans la respiration, perturbation dont l'importance est fonction de l'âge et des différents symptômes. Ainsi, la consommation d'oxygène par les racines au stade BRR est bien plus importante, quel que soit l'âge de la plante, qu'au stade "Corky root". Au stade BRR, les cellules ont encore un contenu qui concomme de l'oxygène. Par contre, au stade liégeux, les cellules sont soit en voie de dégénérescence soit complè-

tement vides.

La classification des différentes espèces et variétés en plantes sensibles (toutes les variétés cultivées), demi-résistantes (L. peruvianum, Espalier) et résistantes (L. hirsutum) peut d'ailleurs se faire d'après la consommation d' O_2 observée chez des plantes de quatre mois obtenues en pot au laboratoire. Pour les plantes sensibles, nous enregistrons une forte diminution de la respiration par rapport aux témoins sains, les tissus brunis étant en grande partie subérisés, morts ou en voie de dégénérescence. La respiration de plantes résistantes (L. hirsutum) reste inchangée, tandis que celle des demi-résistantes (L. peruvianum, Espalier) est encore nettement supérieure à celle des témoins sains, les tissus étant encore en grande partie au stade BRR. Ces observations confirment la conclusion que la moindre sensibilité de L. peruvianum et d'Espalier est due au moins en partie au retard dans l'attaque du système racinaire.

L'effet des filtrats d'une culture de 18 jours de P. lycopersici sur la respiration des racines de différentes espèces et variétés n'est pas en relation avec la sensibilité variétale, mais diffère suivant l'espèce ou la variété. Aussi, la résistance à P. lycopersici semble ne pas provenir de la suppression ou de la détoxification des métabolites toxiques du parasite.

Nous savons que les mécanismes de brunissement sont toujours associés à l'oxydation des phénols de la plante par l'intermédiaire d'enzymes présentant une activité PPO, et que l'intensité du brunissement dépend de la présence de corps réducteurs comme l'acide ascorbique. Nous avons mis en évidence dans les tissus de tomate la présence d'une PPO permettant l'oxydation de phénols qui induisent le brunissement de plantules de tomate et la formation de barrière liégeuses dans les tubercules de pommes de terre. L'activité de cette PPO est plus élevée

dans les racines brunes et liégeuses que dans les racines saines. Son activité maximale coïncide avec la plus forte consommation d'oxygène par les tissus attaqués, donc avec le plein développement de la maladie.

L'augmentation de l'activité AO au cours du développement des symptômes et la présence d'un taux de corps réducteurs plus important dans les tissus attaqués semblent indiquer que l'ascorbique oxydase ne joue aucun rôle dans les phénomènes de brunissement.

La grande activité PPO dans les tissus de l'espèce résistante L. hirsutum en l'absence de symptômes visibles suggère une résistance par hypersensibilité d'ordre biochimique. La diminution de l'activité AO pourrait aussi être liée à la résistance de cette espèce. Cette faible activité pourrait en effet maintenir le pouvoir réducteur de la cellule élevé retardant ainsi le brunissement, donc la mort de la cellule. Celle-ci pourrait libérer davantage de substances toxiques pour le parasite, ce qui conduirait à stopper sa progression. Les nécroses se trouveraient ainsi limitées à un nombre de cellules tellement réduit que les taches sont invisibles.

Par contre, les tissus des plantes demi-sensibles et sensibles possèdent une activité PPO et AO élevées. La moindre sensibilité de L. peruvianum et d'Espalier est principalement due au retard dans l'attaque du système racinaire. Cependant, les réactions à l'infection semblent être identiques à celles des variétés sensibles en ce sens qu'elles se traduisent par la manifestation de symptômes visibles.

Malgré les fortes réactions de défense de la plante qui se traduisent par des phénomènes de brunissement et de subérisation, P. lycopersici continue à survivre dans les tissus attaqués. Nos tests in vitro ont montré que ce champignon est très tolérant aux produits d'oxydation...

des phénols. Sa tolérance est due, entre autres, à la production d'une PPO qui détoxifie les phénols, en les polymérisant en produits colorés. Il participerait ainsi à la manifestation des symptômes. Nous ignorons cependant l'importance relative, d'une part de l'activité PPO du champignon, d'autre part de celle de la plante. Il est à remarquer que par leur spécificité différente, elles permettraient l'oxydation d'un plus grand nombre de phénols.

P. lycopersici pourrait participer aussi à la manifestation des symptômes par la production d'une B. glucosidase qui hydrolyse les glucosides et particulièrement ceux dont l'aglycone est un phénol. Les phénols libérés par le champignon pourraient ensuite être oxydés par l'intermédiaire des PPO de la plante et du parasite. Peut-être que ces phénols libérés participent-ils directement à la formation du suber ?

B- Orientations futures

Nous venons de donner un bref résumé de nos principaux résultats. Cependant, le sujet est encore très vaste et mériterait d'être repris. Nous avons soulevé au cours de nos discussions de nombreux problèmes touchant la conservation du parasite dans le sol, son entrée en activité, les mécanismes de résistance, la manifestation des symptômes etc...

Cependant, les questions qui nous paraissent primordiales et qui mériteraient d'être étudiées sont les suivantes :

- Compléments à la conservation dans le sol : méthode de détection du parasite dans le sol, sa durée de survie, facteurs affectant les structures de conservation, effet de cultures intermédiaires.

- Problèmes de la fongistase.

- Rôle des exsudats racinaires dans l'entrée en activité du parasite et dans les mécanismes de résistance.

- Recherches de certaines techniques permettant l'accroissement de la résistance du système racinaire à des périodes critiques.

- Influence de certaines substances inhibitrices incorporées au sol.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

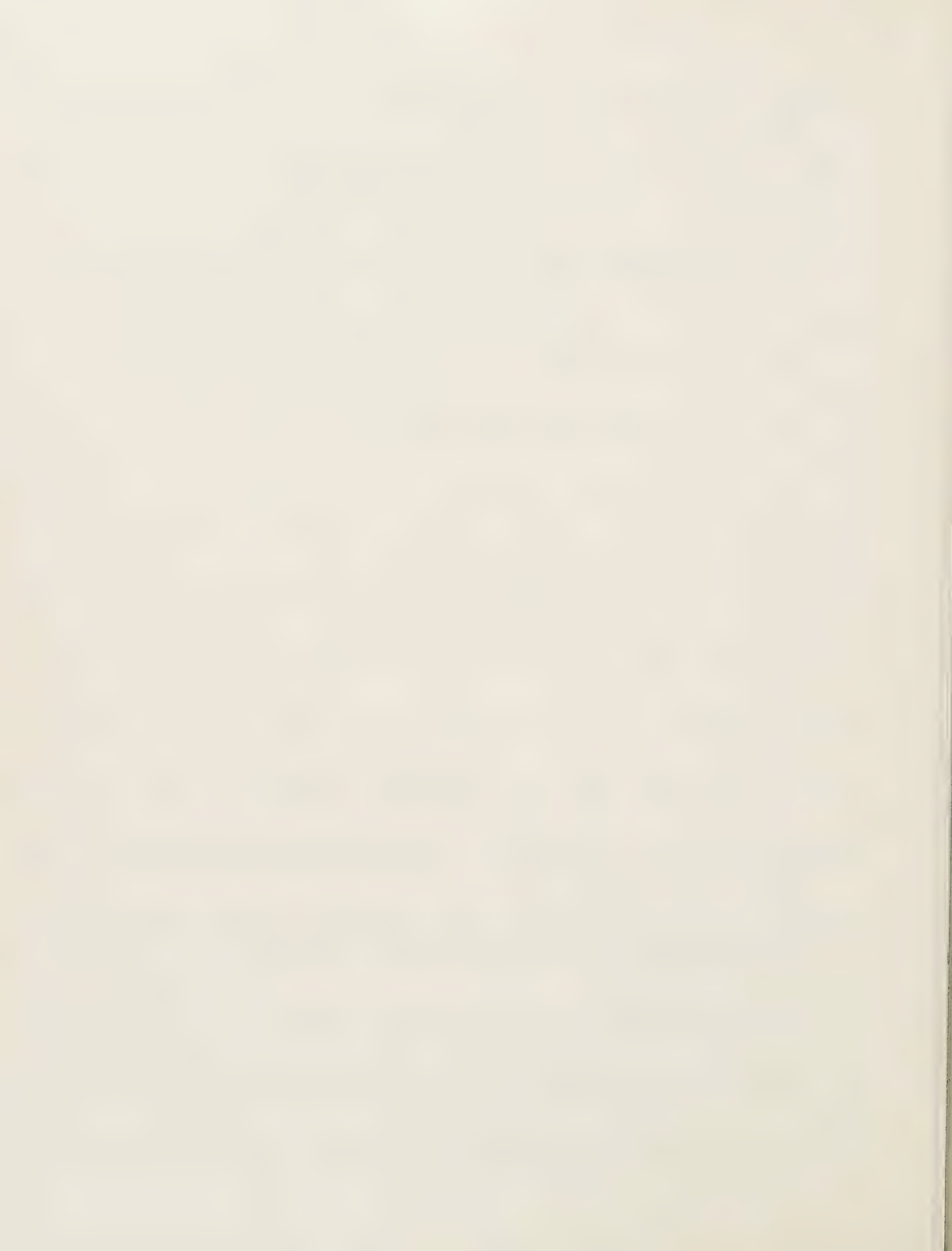
=====

BIBLIOGRAPHIE : PREMIERE PARTIE.

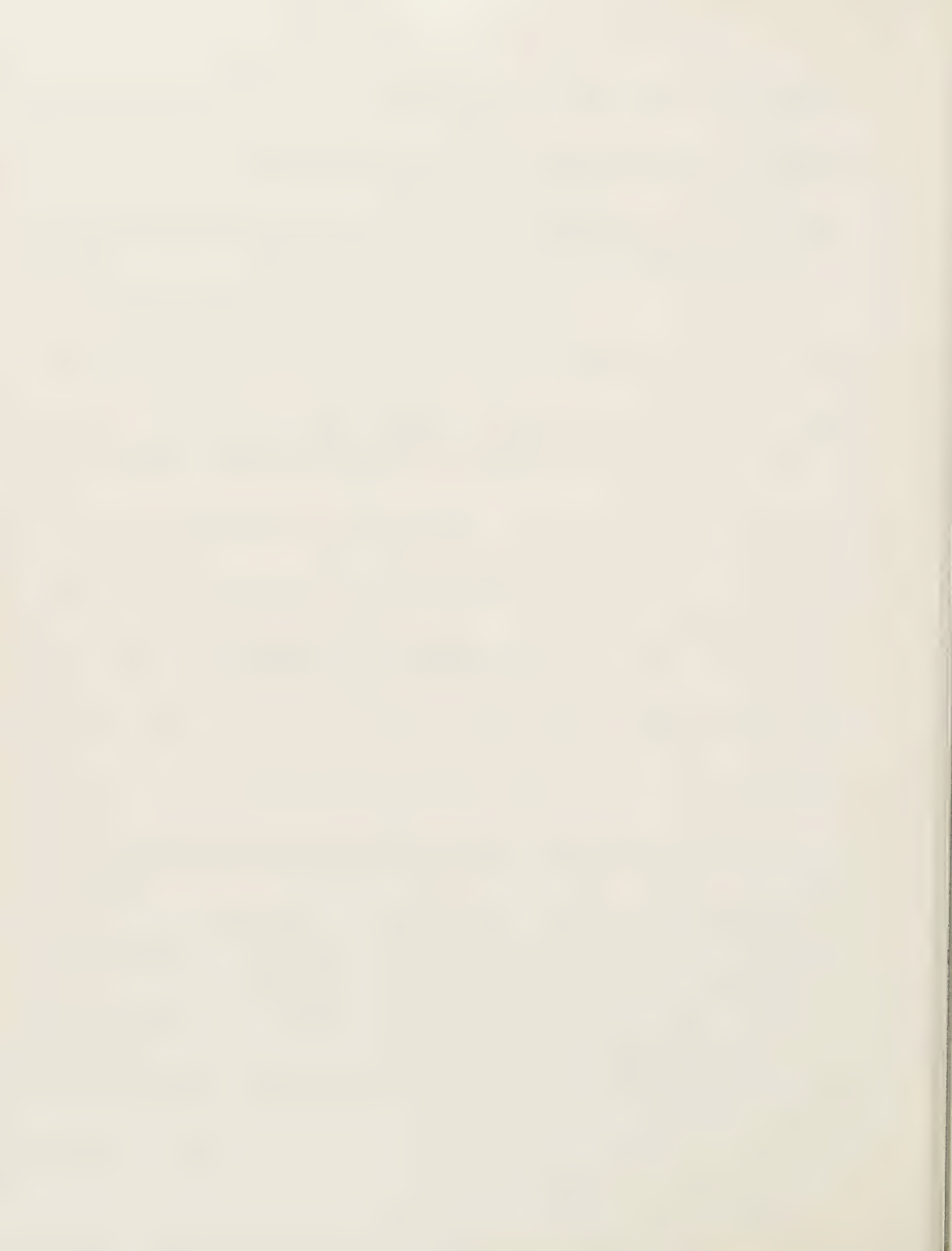
- BRAVENBOER L.-1955. Soil disinfection with fumigants in glasshouse tomatoes. Rep. 14 th Int. Hort. Congr. : 641-646.
- BRAVENBOER L., PET G.-1963. Control of soil-borne diseases in tomatoes by grafting on resistant rootstocks. Proc. 16th Int. Hort. Congr. 1962. 2 : 317-324.
- CHESTERS-C.G.C., HORNBY D.-1965. Studies on Colletotrichum coccodés. Alternative hosts tests and tomato fruit. Inoculation using a typical tomato root isolate. Trans. Brit. Mycol. Soc., 48.4 : 583-594.
- COLQUHOUN T.T.-1941. Black dot root of tomatoes. J. Dep. Agr. S. Austr., 44 : 572-575.
- COOKE I.J.-1962. Damage to plant roots caused by urea and anhydrous ammonia. Nature, 194 : 1262-1263.
- DAWSON J.R., JOHNSON R.A.H., ADAMS P., LAST F.T.-1965. Influence of steam-air mixtures, when used for heating soil, on biological and chemical properties that affect seedling growth. Ann. Appl. Biol., 56 : 243-251.
- DOOLITTLE S.P.-1954. The use of wild Lycopersicon species for Tomato disease control. Phytopathologie, 44.8 : 409-414.
- EBBEN M.H., WILLIAMS P.H.-1953. Tomato root rot. Rep. Exp. Res. Sta. Cheshunt, 38 : 23-25.
- EBBEN M.H., WILLIAMS P.H.-1956. Brown root rot of Tomatoes. I-The associated Fungal Flora. Ann. Appl. Biol., 44.3 : 425-436.
- GERLACH W., SCHNEIDER R.-1964. Nachweis eines Pyrenochaeta-Stadiums bei Stämmen des Korkwurzelerregers der Tomate. Phytopath. Z., 50 : 262-269.
- GERLACH W., SCHNEIDER R.-1966. Infektionseversuche mit Pyrenochaeta terrestris und der Kurkurlzel Pyrenochaeta an Tomate und Küchenzwiebel. Phytopath. Z., 56 : 19-24.
- GRAHAM C.W.-1966. Potato root eelworm and tomato rootstocks. Plant. Path., 15 : 76-85.
- HEIMBECK L.S.-1954. On the Etiology of brown roots, yellowing and wilt due to B type (Dienes) L. (Kleineberger) forms of bacteria, with special reference to pea wilt. Oslo. (d'après EBBEN et WILLIAMS 1956).

.....

- HESS W.M.-1962. Use of near ultraviolet light to induce fruiting of Pyrenochaeta. Phytopathology, 52 :735.
- JAMES G.L.-1966. Effect of the causal Fungus of BRR of Tomatoes on the Hatch of potato root eelworm, Heterodera rostochiensis woll. Nature, 212.5069 1466-1467.
- JAMES G.L., HAGUE N.G.-1967. Methyle bromide fumigation of soil infested by the fungus causing brown root rot complex of Tomatoes and by the Potato cyst Nematodes. P.L.Path., 16 :148-152.
- JAMES G.L.- 1968. The interrelationships of the causal Fungus of brown root rot of tomato and Potato root eelworm, Heterodera rostochiensis. Ann. Appl.Biol., 61-3 :503-510.
- JENKINS W.A.-1948. Root rot disease complexes of tobacco in Virginia. I- Brown root rot. Phytopathology, 38 :528-541.
- JOHNSON J.-1939. Studies on the nature of brown root rot of tobacco and other plants. J.Agr.Res., 58 :843-863.
- KLINKENBERG C.H - 1940. Abnormale Kurkvorming. Acad. Proefschrift Univ. Amsterdam : 85-102 (d'après TERMOHLEN 1962).
- LARGE. J.G.-1965. Tomato propagation. II-Temperatures and planting stage for the November sown crop. Expl.Hort., 13 :17-23.
- LAST F.T., EBBEN M.H.-1963. Brown Root Rot of Tomatoes N.A.A.S. q.Rev., 62 : 68-75.
- LAST F.T., EBBEN M.H.-1966. The epidemiology of Tomato brown root rot. Ann. Appl.Biol., 57 : 95-112.
- LAST F.T., EBBEN M.H., READ W.H.-1966. Features of Tomato brown root rot and its control. Scientific Horticulture, 18 :36-49.
- LAST F.T., EBBEN M.H., ROTHWELL J.B., JONES D.A.G.-1968. Effects of cultural treatments on the incidence of, and damage done by, tomato brown root rot. Ann. Appl.Biol., 62 :55-75.
- LAST F.T., EBBEN M.H., HOARE R.C.-1969. Build up of tomato Brown root rot caused by Pyrenochaeta lycopersici Schneider and Gerlach. Ann. Appl.Biol. 64.3 : 449-459.
- MAC NEILL B.H.-1955. Colletotrichum root rot of greenhouse tomatoes. Pl.Dis. Repr., 39 :45-46.
- Mc KAY R.-1942. Tomato root rot Colletotrichum atramentarium (Berk.Br.) Taubenh. Dep.Plant.Path., Univ.College, Dublin, 39 : 272-276.
- MOREAU M., MOREAU C.-1956. Examen comparatif du mycelium et des sclérotés chez diverses souches de Rhizoctonia solani Kühn et de Morchella hortensis Bond. Bull.Soc.Bot.France, 103 :117-120.



- PARMETER J.R.- 1965. The Taxonomy of sterile Fungi. *Phytopathology*, 55.8 : 826-828.
- PREECE T.F.-1964. Observations on the Cocky root disease of Tomatoes in England. *Trans. Brit.Mycol.Soc.*, 47.3 : 375-379.
- READ W.H.- 1960. Investigation in soil sterilization : Preliminary results of a comparison between metham-sodium, steam and chloropicrin. *Rep. glasshouse crops Res.Int.* 1959, :105-107.
- READ W.H.- 1964. Crop protection. *Rep. glasshouse crops Res. Int.*, 1963 : 93-101.
- RICHARDSON J.K., BERKELEY G.H.-1944. Basal rot of Tomato. *Phytopathology*, 34 : 614-621.
- RISSE G., LAUGIE M.-1968. Mise en évidence de la sensibilité de divers cultivars de Melon (*cucumis Melo L.*) à Pyrenochaeta sp., agent de la "Mala-die des racines liégeuses" de la Tomate. *Ann.Amelior. Plantes*, 18.1 : 75-80.
- ROLL-HANSEN J.- 1952. Damping av Jord til tomat (steaming soil for tomatoes). *Statens forskøgsgard. Kvithamar, Melding nr.*, 10.(D'après TERMOHLEN 1962)
- SCHNEIDER R.- 1965. Nachweis des Erregers der, "Pink root" der Zwiebeln, Pyrenochaeta terrestris, in Deutschland. *Phytopath. Z.*, 53 : 249-254.
- SCHNEIDER R., GERLACH W.- 1966. Pyrenochaeta lycopersici nov. spec., der Erreger der Korkwurzelkrankheit der Tomate. *Phytopath. Z.*, 56 : 117-122.
- SMITH J.W.M., PROTOR P.-1965. Use of disease resistant rootstocks for Tomato crops. *Expl.Hort.*, 12 : 6-20.
- SMITH J.W.M.- 1966. A new tomato rootstock seed parent. *Euphytica*, 15 : 394-403.
- SZTEYN K.- 1962. Interspecific crosses in the genre Lycopersicon. I- Backcrosses to Lycopersicon glandulosum. *Euphytica*, 11 : 149-156.
- TERMOHLEN G.P.-1957. Kurkwortelverschijnselen van tomaat, veroorzaakt door een Steriel mycelium. *T. Pl. Ziekten*, 63 : 369-374.
- TERMOHLEN G.P.- 1962. Onderzoekingen over Kurkwortel van tomaat en over de Kurkwortelschimmel. *T. Pl. Ziekten*, 68 : 295-367.
- ULJEE A.H.- 1964. Ammonium nitrogen accumulation and root injury to tomato plants. *N.Z. Jl.Agric.Res.*, 7 : 343.
- WARCUP J.H.- 1959. Studies on basidiomycetes in soil. *Brit.Mycol.Soc.Trans.*, 42 : 45-52.



- WARCUP J.H., TALBOT P.H.B.-1962. Ecology and indentity of mycelia isolated from soil. Brit. Mycol.Soc.Trans., 45 : 495-518.
- WELVAERT W, VELDEMAN R.- 1961. Kurkwortel van tomaat en Zijnbestrijding door grondonstmetting. Meded. Landb Hoogesch. Opzoek Stns. Gent, 26 : 1394 - 1400.
- WHITNEY H.S., PARMENTER J.R.- 1964. The perfect stage of Rhizoctonia hiemalis.Mycologia, 56 : 114-118.
- WILLIAMS P.H.- 1929. Fungi occuring in Tomatoes roots. Rep. Exp. Res. sta. Cheshunt, 14 : 42.

BIBLIOGRAPHIE : DEUXIEME PARTIE

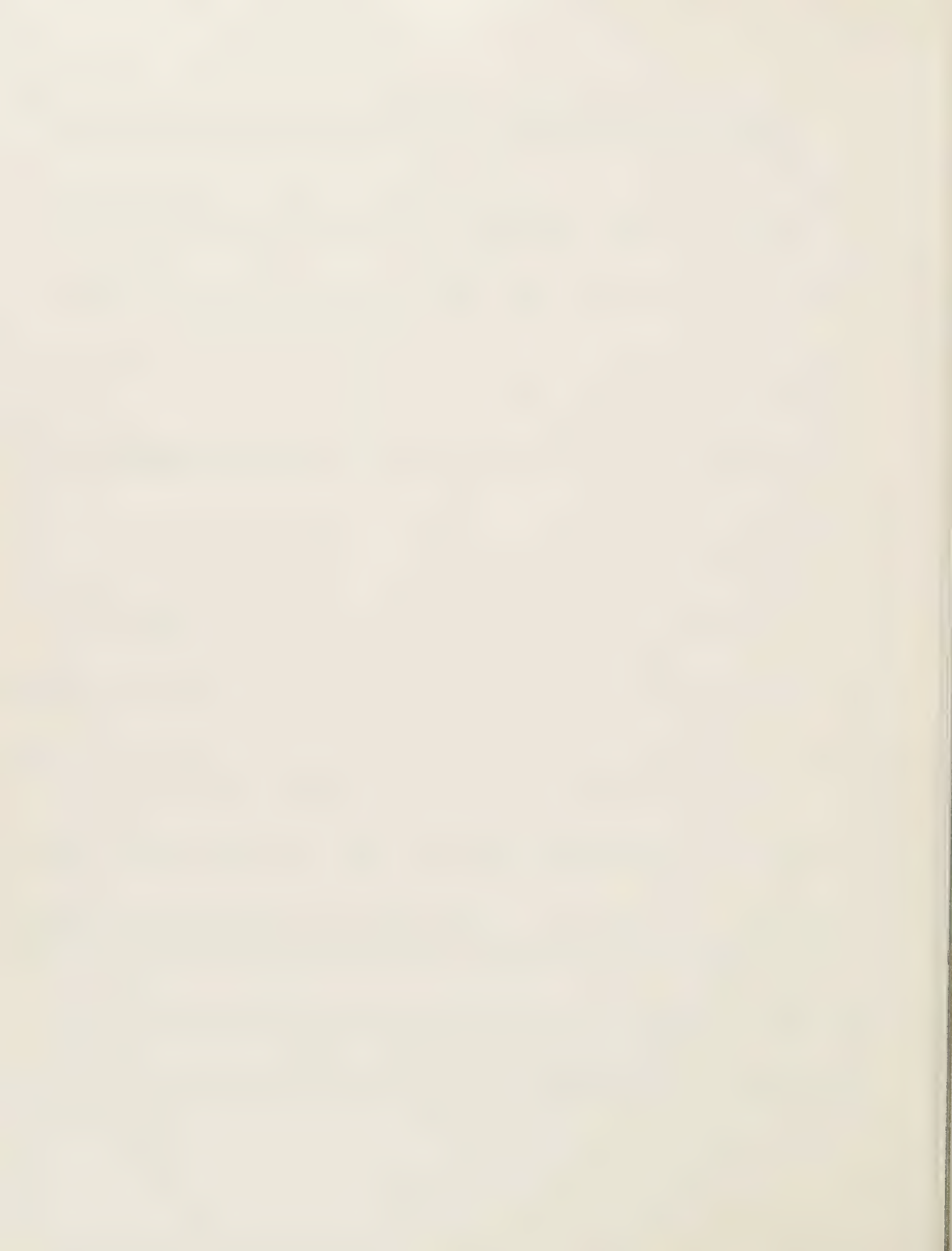
- ANWAR A.A.- 1949. Factors affecting the survival of Helminthosporium sativum and Fusarium lini in soil. Phytopathology, 39 : 1005-1019.
- ASADA Y., MATSUMOTO I.- 1967. Formation of lignin in the root tissus of Japanese radish affected by Alternaria japonica. Phutopathology, 57. 12 : 1339-1343.
- AVIZOHAR H.Z., SHACKED D.-1968. A baiting method for estimating the saprophytic activity of Sclerotium rolfsii in soil. Phytopathology, 58.4 : 410-413.
- BUTLER F.C.- 1953. Saprophytic behaviour of sonne cereal root rot Fungi. I- Saprophytic colonization of wheat straw. Ann. Appl. Biol., 40 : 284-297.
- BUTLER F.C.- 1953. Saprophytic behaviour of sonne cereal root rot Fungi. II- Factors influencing saprophytic colonization of wheat Straw. Ann. Appl. Biol., 40 : 298 - 304.
- BUTLER F.C.- 1953. Saprophytic behaviour of sonne cereal root rot Fungi. III - Saprophytic survival of wheat straw buried in soil. Ann. Appl. Biol., 40 : 305- 311.
- BUXTON W.- 1957. Some effects of pea root exudates on physiologic races of Fusarium oxysporium f. pisi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 40 : 145 -154.
- CALDWELL R. 1963. Observation on the fungal flora of decomposing beech litter in soil. Trans. Brit. Mycol. Soc., 46 : 249 -261.
- CHANG I.P., KOMMEDAHL T.- 1968. Biological control of seedling Blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. Phytopathologie, 58. 10 : 1395-1401.

.../...

- CHIN S.H.F., LEDINGHAM R.J., SALLANS B.J., SIMMONDS P.M.- 1953. A mechanism for the control of common root rot of wheat. *Phytopathology*, 43 : 761.
- COCHRANE V.W.- 1958. *Physiology of Fungi*. John Willey & Sons. In. London. 524PP.
- COOK A.H., COX S.F., FARMER T.H., LACEY M.S.-1947. Production of antibiotics by Fusaria. *Nature*, 160. 4053 : 31-32.
- DICKINSON C.H., SHERIDAN J.J.- 1968. Studies on the survival of Mycosphaerella pinodés and Ascochyta pisi. *Ann. Appl. Biol.*, 62. 3 : 473-483.
- DUFRENOY J.- 1936. Le rôle des amino-acides et des composés phénoliques dans la susceptibilité ou la résistance des plantes aux maladies. III- Congr. Internat. Pathol. comparée, 1 : 16-38.
- DUFRENOY J.- 1945. The pathological condition of the oxidation - reduction systems as a criterium of injury in plants. *Bio Dynamica*, 5 : 309-324.
- EBBEN M.H., WILLIAMS P.H.- 1956. Brown root rot of tomatoes. - the associated fungal flora. *Ann. Appl. Biol.*, 44.3 : 425 - 436.
- EBBEN M.H.- 1959. Brown root rot of tomatoes. I- the fungal flora of the Rhizosphere. *Ann. Appl. Biol.*, 47. 1 : 17-27.
- ERWIN D.C., KATZNELSON H.- 1961. Suppression and stimulation of mycelial growth of Phytophthora cryptogea by certain thiamine requiring and certain thiamine - synthesizing bacteria. *Can.J. Microbiol.*, 7 : 945-950.
- FORLOT P.- 1965. Contribution à l'étude de Colletotrichum coccodés (Wallr) Hugues. Thèse, Faculté des Sciences de Nancy.
- GARETT S.D.- 1956. *Biology of root-infecting Fungi*. Cambridge University Press, Londres et New-York. 292 PP.
- GAUMANN E.- 1950. *Principles of plant infection*. Crosby Lockwood - London, 543 PP.
- GRIFFIN D.M.- 1966. Soil water terminology in mycology and Plant Pathology. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 49 : 367-368.
- HAWKINS L.A., HARVEY R.B.- 1919. Physiological study of the parasitism of Pythium debaryanum Hesse on potato tuber. *J.Agr.Res.*, 18 : 275-298.
- HORNBY D.- 1968. Studies on Colletotrichum coccodés. III- Some properties of the Fungus in soil and in tomato roots. *Trans.Br.Mycol. Soc.*, 51 : 541-553.

- HUSSEY R.S., KRUSBERG L.R.- 1968. Histopathology of resistant reaction in Alaska pea seedlings to two populations of Ditylenchus dipsaci. Phytopathology, 58 : 1305 - 1310.
- I.N.R.A.- 1964. Tomato - Extrait du rapport annuel. I.N.R.A. Domaine Saint-Maurice, Montfavet : 49-69.
- JACKSON R.M.- 1957. Fungistasis as factor in the rhizosphere. Nature : 180 : 96-97.
- JACKSON R.M.- 1965. Antibiosis and fungistasis of soil microorganisms. Dans : Ecology of soil - born plant pathogens. ed. BAKER K.F. et SNYDER W.C. University of California Press. Berkeley, 571 PP : 363 - 373.
- JAKUBCZYK H.- 1962. Studies on the parasitism of colletotrichum atramentarium II - Studies on the pathogenicity of C. atramentarium to potatoes and inoculation experiments. Acta Agrobot., 12 : 231 - 259.
- JOHNSON J.- 1939. Studies of the nature of brown root rot of tobacco and other plants. J. Agr. Res., 58 : 843-863.
- JONES A.P.- 1931. The histogeny of potato scab. Ann. Appl. Biol., 18 : 313-333.
- JOUAN B., LEMAIRE J.M., ARNOUX J.- 1964. Eléments d'appréciation des interactions entre champignons cultivés in vitro. Phytiairie - Phytopharmacie 13 : 185 -195.
- LANGERON M.- 1949. Précis de microscopie. Masson et Cie, Paris.
- LAST F.T., EBBEN M.H.- 1966. The epidemiology of tomato brown root rot. Ann. Appl. Biol., 57 : 95-112.
- LAST F.T., EBBEN M.H., ROTHWELL J.B. JONES D.A.G.- 1968. effects of cultural treatments on the incidence of, and damage done by, tomato brown root rot. Ann. Appl. Biol. , 62 :55-75.
- LOCKWOOD J.L.- 1959. Lysis of non-soil, soil invading and soil inhabiting fungi by soil. Phytopathology, 49 : 544.
- LOCKWOOD J.L.-1964. Soil fungistasis. Ann.Rev. Phytopathol., 2 :341-362.
- MACER R.C.F.- 1961. The survival of Cercospora herpotrichoides in wheat straw. Ann. Appl. Biol. , 49 : 165-172.
- Mc KAY R.- 1942. Tomato root rot - Colletotrichum atramentarium (Berk.Br.) Taubenh. Dep. Plant. Path. Univ. College, Dublin , 39 : 272-276.
- Mc NEW G.L.- 1960. The nature, origin, and evolution of parasitism. Dans "Plant pathology" HORSFALL J.G. et DIMOND A.E., 2, Academic Press, N Y. 715 PP : 19-69.

- MESSIAEN C.M., MAS P., BEYRIES A., VENDRAN H.- 1965. Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. IV - lyse mycelienne et fromes de conservation dans le sol chez les Fusarium. Ann. Epiphyt., 16 : 107-128.
- NAIM M.S., HUSSEIN A.M.- 1966. The interaction between the Rhizosphère bacteria of cotton and Fusarium oxysporum in culture. J. Microbiol. U.A.R., 1 : 85-89.
- NYVALL R.F., KOMMEDAHL T.- 1968. Individual thickened Hyphae as survival structure of Fusarium moniliforme in corn. Phytopathology, 58. 12 : 1704-1707.
- PADY S.M., KRAMER C.L.- 1960. Kansas aeromycology. VI- Hyphal fragments. Mycologia, 52 : 681 - 687.
- PAPAVIZAS G.L.- 1968. Survival of root infecting fungi in soil. VI - Effect of amendments of bean root rot caused by Thielaviopsis basicola and on inoculum density of the causal organism. Phytopathology, 58.4 : 421-428.
- PARK D.-1959. Some aspects of the biology of Fusarium oxysporum Schl. in soil. Ann. Bot. N.S., 23 : 35-49.
- PARK D.-1965. Survival of microorganisms in soil. Dans : Ecology of soil-borne plant pathogens, prelude to biological control. BAKER K.F., SNYDER W.C., University of California Press, 571 PP : 82-98.
- PARKINSON D., TAYLOR G.S., PEARSON R.- 1963. Studies on fungi in the root rot region. I- The development of fungi on root surface of crop plants. Plant and soil, 19 : 332- 349.
- PARKINSON D., PEARSON R.- 1967. Studies on fungi in the root region. VI- The occurrence of sterile dark fungi on root surface. Plant and soil, 27. 1 : 113-119.
- PARKINSON D., PEARSON R.-1967. Studies on fungi in the root region. VII- Competitive ability of sterile dark fungi. Plant and soil, 27. 1 : 120-130.
- PETHUBRIDGE G.H.- 1918. Notes on Some saprophytic species of fungi associated with diseased potato plants and tubers. Trans. Br. Mycol. Soc., 6 : 104-120.
- PREECE T.F.-1964. Observation on the Corky root disease of tomatoes in England. Trans. Brit. Mycol. Soc., 47.3 : 375-379.
- PUGH A.J.H.- 1958. Leaf litter fungi found on Carex paniculata. Trans. Brit. Mycol. Soc., 41 : 185-195.



- SADASIVAN T.S., SUBRAMANIAN C.V.-1960. Interaction of pathogen, soil, other microorganisms in the soil, and host. Dans Plant Pathology, HORSFALL J.G. et DIMOND A.E. Academic Press N.Y. 2. 716 PP : 273-313.
- SCHEFFER T.C.- 1935. A tube for culturing fungi. Science, 82 : 467-468.
- SCHROTH M.N., HILDEBRAND D.C.- 1964. Influence of plant exudates on root-infecting fungi. Ann. Rev. Phytopathol., 2 : 101-132.
- SCOTT M.R.-1956. Studies of the biology of Sclerotium cepivorum. I- Growth of the mycelium in soil. Ann. Appl. Biol. 44 : 576-583.
- STOVER R.H.- 1958. Studies on Fusarium wilt of bananas. I- some factors influencing survival and saprophytic multiplication of F. oxysporum f. cubense in soil. Canad. J. Botany, 36 : 311-324.
- SUZUKI N.- 1957. Studies on the violet root rot of sweet potatoes caused by Helicobasidium mompa. VI - Histochemical studies of the infected tissues. Chemical changes as results of infection. Bull. Nat. Int. Agri. Sci. C., 8 : 69-130.
- TERMOHLEN G.P.- 1962. On the Corky root of tomato and the Corky root fungus. T. Pl. Ziekten., 68.6 : 295-367.
- TISDALE W.H.- 1917. Flax wilt : a study of the nature and inheritance of wilt resistance. J. Agr. Research., 33 : 845-872.
- TOWNSEND B.B., WILLETTS H.J.-1954. The development of sclerotia of certain fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc. 34 : 213-221
- TRUSZKOWSKA W., NARKIEWICZJODKO M.- 1969. Recherches sur l'influence des champignons saprophytes sur les champignons parasites des racines de tomate. Acta. Mycol., 5 : 23-49.
- TVEIT M., WOOD R.K.S.-1955. The control of Fusarium blight in oat seedlings with antagonistic species of Chaetomium. Ann. Appl. Biol., 43 : 538-552.
- WHITE N.H.-1945. The etiology of take-all disease of wheat. II- Progressive necrosis and microfloral succession in root and crown tissue of wheat. J. Coun. Sci. industr. Res. Aust., 18 : 329-335 d'après GARRETT (1956), Biology of root infecting Fungi, Cambridge university Press Londres. 292 PP : 163.
- WILLIAMS P.H., EBBEN M.H.- 1951. Brown root rot of the tomato. Rep. Exp. Res. Sta. Cheshunt., 37 : 22-26.
- WOOD R.K.S.- 1960. Chemical Ability to breach the host barriers, Dans : Plant Pathology. HORSFALL J.G., DIMOND A.E. Academic Press. N.Y. 2 : 233-272.
- WOOD R.K.S.-1967. Disease resistance substances present in plants before infection. Dans : Physiological plant pathology - Blackwell scientific publications Oxford. 570 PP : 397-438.
- YOSHII H.- 1948. Patho-histological observation of tomato inoculated with Piricularia oryzae. Ann. Phytopathol. Soc. Japan., 13 : 14-18.

BIBLIOGRAPHIE : TROISIEME PARTIE

- ALLEN P.J.- 1942. Changes in the metabolism of wheat leaves induced by infection with Powdery mildew. Am. J. Botany, 29 : 425-435.
- ALLEN P.J.- 1953. Toxins and tissue respiration. Phytopathology , 5.43 : 221-229.
- ASADA Y.- 1957. Studies on the susceptibility of Akiochi (autumn decline) rice plant to Helminthosporium blight. III - Changes of nitrogen compounds, carbohydrates, reducing ascorbic acid and respiration accompanied by the infection of Cochliobolus miyabeanus and existence of hyphae in diseased plots. Ann. Phytopath. Soc. Japan., 22 : 103-106.
- BECKMAN C.H.- 1967. Respiratory response of radish varieties resistant and susceptible to vascular infection by Fusarium oxysporum f. conglutinans. Phytopathology , 57. 7 : 699-702.
- BLOSS H.E., GRIES G.A.- 1967. Physiologic responses of resistant and susceptible root tissues infected with Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology , 57. 4 : 380-383.
- CHETVERIKOVA Ye.P.-1952. Dans : Biochemistry and physiology of plant immunity. RUBIN B.A, ARTSKHOVSKAYA Ye.V. Pergamon Press. 358 PP: 125-126. 1963.
- COCHRANE V.W.-1968. Physiology of Fungi. JOHN WILLEY & sons. In. London. 524PP.
- CUNNINGHAM H.S.- 1953. A histological study of the influence of sprout inhibitors on Fusarium infection of potato tubers. Phytopathology, 43. 2 : 95-98.
- DALY J.M., SAYRE R.M.- 1957. Relation between growth and respiratory metabolism in Safflower infected by Puccinia carthami. Phytopathology, 47 : 163-168.
- DAVIS D., WAGGONER P.E., DIMOND A.E.- 1953. Conjugated phenols in the Fusarium wilt syndrome. Nature, 172 : 959- 961.
- DEVERALL B.J., WOOD R.K.S.- 1961. Chocolate spot of beans (*vicia faba* L.). Interaction between phenolase of host and pectic enzymes of the pathogen. Ann. Appl. Biol., 49 : 473-487.
- DIEM H.G.-1967. Influence de quelques polyphénols sur la croissance et la sporulation de Phytophthora cryptogea Petnyb. et Laff. Bull. Ecol. Nat. Sup. Agro. Nancy. 10.1 : 29-34.
- EBBEN M.H., WILLIAMS P.H.- 1956. Brown root rot of tomatoes. I- The associated fungal flora. Ann. Appl. Biol. 44.3 : 425-436.
- EIGER I., DAWSON C.R.- 1949. Substrate specificity of polyphenol oxidase from sweet potato and from mushroom. Dans : Melanins, R.A. NICOLAUS. 1968. HERMANN. PARIS. 310 PP : 30.

- FAHRAEUS G.- 1952. Formation of laccase by Polyporus versicolor in different culture media. *Physiol. Plant.*, 5 : 284.
- FAHRAEUS G.- 1954. Further studies in the formation of laccase by Polyporus versicolor. *Physiol. Plant.*, 7 : 704-712.
- FARKAS G.L., LEDINGHAM G.A.- 1959. Studies on the PPO system of wheat stem rust uredospores. *Canad. J. Microbiol.*, 5 : 37-46.
- FARKAS G.L., KIRALY.- 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. *Phytopathologische Z.*, 44.2 : 105-150.
- FEHRMANN H., DIMOND A.E.-1967. Peroxidase activity and Phytophthora resistance in different organs of the potato plants. *Phytopathology*, 57.1 : 69-72.
- FLING M., HOROWITZ N.H., HEINMANN S.F.- 1963. The isolation and properties of crystalline tyrosinase from Neurospora. *J. Biol. Chem.*, 238 : 2045-2053.
- GAUMANN E.- 1953. Principles of plant infection. Crosby Lockwood. London. 543 PP.
- GOTHOSCAR S.S., SCHEFFER R.P., STAHMANN M.A., WALKER J.C.- 1955. Further studies on the nature of Fusarium resistance in tomatoes. *Phytopathology*, 45 : 303-307.
- HADWIGER L.A.- 1967. Changes in Phenylalanine metabolism associated with pisatin production. *Phytopathology*, 57 : 1258-1259.
- HALL C.B., KNAPP F.W., STALL R.E.- 1969. Oxydase activity in bacterially induced gray wall of tomato fruit. *Phytopathology*, 59.2 : 267-268.
- HATTORI S., SHIROYA M.- 1955. Studies on the browning and blackening of plant tissues. II- On the interaction of DOPA and a specific oxydase in the leaves of Stizolobium hassjoo. *Physiol. Plantarum.*, 8 : 63-70.
- HERGERT H.L., KURTH E.F.- 1952. The chemical nature of cork from Douglas fir bark. *Tappi*, 35 : 59-66.
- HERGERT H.L.- 1958. Chemical composition of cork from white fir bark. *Forest. Prod. J.*, 8 : 335-339.
- HESS E.H.- 1958. The polyphenolase of tobacco and its participation in amino acid metabolism. I - Manometric studies. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 74.1 : 198-208.
- HILDEBRAND D.C., SCHROTH M.N.-1964. Antibiotic activity of pear leaves against Erwinia amylovora and its relation to B. glucosidase. *Phytopathology*, 54 : 59-63

- HILDEBRAND D.C., SCHROTH M.N.-1964. Arbutin-Hydroquinone complex in pear as a factor in fire Blight development. *Phytopathology*, 54 : 640-645.
- INGRAHAM L.L.- 1955. Reaction inactivation of PPO : catéchol and oxygen dépendance. *J.Am. Chem. Soc.*, 77 : 2875-2876.
- JENNINGS P.H., BRANNAMAN B.L., ZSCHEILE F.P.- 1969. Peroxidase and polyphenol oxidase activity associated with Helminthosporium leaf spot of maize. *Phytopathology*, 59.7 : 963-967.
- JOHN V.T., WEINTRAUB M.- 1967. Phenolase activity in Nicotiana glutinosa infected with tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 57.2 : 154-158.
- JOHNSON G., SCHAAL L.A.- 1952. Relation of chlorogenic acid to scab resistance in potatoes. *Sciences*, 115 : 627-629.
- JOLLEY R.L. jr., MASON H.S.-1965. The multiple forms of mushroom tyrosinase interconversion. *J. Biol. Chem.*, PC: 1489- 1491.
- JOUBERT J.J., HILDEBRAND D.C. , SCHROTH M.N. 1970. Utilisation of B. glucosides for growth by fluorescent Pseudomonads. *Phytopathology*, 60.5 : 502-505.
- KEDAR N.- 1959. The peroxidase test as a tool in the selection of potato varieties resistant to late blight. *Amer.Potato.J.*, 36 : 315-324.
- KENTEN R.H.- 1957. Latent phenolase in extract of broad-bean (vicia faba L.) leaves. I - Activation by acid and alkali. *Biochem. J.*, 67 : 300-307.
- KENTEN R.H.- 1958. Latent phenolase in extract of broad bean (vicia faba L.) leaves. II- Activation by anionic wetting agents. *Biochem. J.*, 68 : 244-251.
- KERTEZS D., AZZOPARDI O.- 1960. Oxydation enzymatique des monophénols en présence de substances réductrices. *Bull. Soc. Chem.Biol.*, 42 : 945-953.
- KHANDOBINA L.M., GERASKINA G.V.-1969. Quelques propriétés de la PPO de la carotte saine et infectée par Phoma rostrupii. *Sel'Skokhozjajstv. Biol. Khim.*, 4.5 : 703-706.
- KUC J.- 1968. Biochemical control of disease resistance in plants. *World.Rev. Pest. Control.*, 7.1 : 42-55.
- LATCH G.C.M., HANSON E.W.-1968. Respiratory in Trifolium pratense inoculated and noninoculated with Erysipae polygoni. *Phytopathology*, 58.3 : 297-300.
- LAVOLLAY J., LEGRAND G., LEHONGE G., NEUMANN J.- 1963. Enzyme-substrate specificity in potato polyphenol oxidase. Dans : *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. PRINDHAM J.B. Pergamon Press., 142 PP : 33-36.

- LEVINE W.G.- 1966. Laccase, a review. Dans : The Biochemistry of copper..
PEISACH J. AISEN P., BLUMBERG W.E. Academic Press, 588 PP. : 371-387.
- LINDEBERG G., HOLM G.- 1952. Occurrence of tyrosinase and laccase in fruit
bodies and mycelia of some hymenomycètes. *Physiol. Plant.*, 5 : 100.
- LINDEBERG G., FAHRAEUS G.- 1952. Nature and formation of phenol oxidases in
Polyporus versicolor and zonatus. *Physiol. Plantarum*, 5 : 277-283.
- LINK K.P., ANGELL H.R., WALKER J.C.- 1929. Isolation of protocathechuid acid
from pigmented onion scales and its significance in relation to disease
resistance in onions. *J. Biol. Chem.*, 81 : 369-375.
- LOVREKOVICH L., LOVREKOVICH H., STAHMANN M.A.- 1968. The importance of
peroxidase in the wild fire disease. *Phytopathology*, 58.2 : 193-198.
- MILO G.E., SANTELLI V.- 1967. Changes in the ascorbate concentration of Pinto
leaves accompanying the formation of TMV induced local lesions. *Virology*,
31 : 197-206.
- NEWTON R., ANDERSON J.A.-1929. Studies on the nature of rust resistance in
wheat. IV- Phenolic compounds of the wheat plant. *Canad. J. Res.*, 1 : 86-
99.
- OKASHA K.A., RYUGO K., WILHELM S., BRINGHURST R.S.- 1968. Inhibition of
growth of verticillium alboatrum spolings by tannins and polyphenol from
infected crowns of Verticillium-Resistant and susceptible strawberry
cultivars. *Phytopathology*, 58.8 : 114-117.
- OKASHA K.A., RYUGO K., BRINGHURST R.S.- 1968. Relationships of tannins, poly-
phenolics and reducing sugars to Verticillium wilt Resistance of Straw-
berry cultivars. *Phytopathology*, 58.8 : 1117-1118.
- OKU H.- 1957. Biochemical studies on Cochliobolus miyabeanus. III- Some oxi-
dizing enzymes of rice plant and its parasites and their contribution to
the formation of the lesions. *Ann. Phytopath., Soc. Japan.*, 23 : 169-175.
- OKU H.- 1960. Biochemical studies on Cochliobolus miyabeanus. IV- Fungicidal
action of polyphenols and the role of PPO of the fungus. *Phytopathology*
Z., 38 : 342-354.
- OWENS L.D.-1969. Toxins in plant diseases. Structure and mode of action.
Sciences, 165. 3888 : 18-25.
- PALMER J.K.-1963. Banana polyphenol oxidase. Preparation and properties.
Plant. Physiol., 38 : 505-513.
- PATIL S.S., DIMOND A.E.- 1967. Inhibition of Verticillium polygalacturonase
by oxydation products of polyphenols. *Phytopathology*, 57. 5 : 492-496.

- PATIL S.S., DIMOND A.E.- 1968. Effects of phenols and cytokinins on polygalacturonase production by Verticillium albo-atrum in culture. Phytopathology, 58.6 : 868-869.
- PIERRE R.E., BATEMAN D.F.- 1967. Induction and distribution of Phytoalexins in Rhizoctonia infected bean hypocotyls. Phytopathology, 57 : 1154-1160.
- PHILLIPS J.- 1948. The role of chlorogenic acid in the formation of suberized membranes. Rev. Cytol. et cytophysiol. Vegetale, 10 : 232-233.
- POWELL C.C. jr., HILDEBRAND D.C.- 1970. Fire blight resistance in Pyrus : Involvement of arbutin oxidation. Phytopathology, 60 : 337-340.
- PRINGLE R.B., SHEFFER R.P.-1967. Multiple host specific toxins from Periconia circinata. Phytopathology, 57.5 : 530-532.
- RAUTELA G.S., PAYNE M.G.- 1970. The relationship of peroxidase and orthodiphenol oxidase to resistance of sugar beets to Cercospora leaf spot. Phytopathology, 60. 2 : 238-245.
- RICH S., HORSFALL J.G.- 1954. Relation of polyphenol oxidase to fungitoxicity. Proc.Natl. Acad.Sci. U.S., 40.3 : 139-145.
- ROBB D.A., MAPSON L.W., SWAIN T.- 1964. Activation of the latent Tyrosinase of broad bean. Nature, 201 : 503-504.
- ROSSI R.- 1962. The influence of extracts of rotted apples on the browning of solutions of phenolic substances. Phytopathologische Z., 44.2 : 170-178.
- SANWAL B.D.- 1956. Polyphenol oxidase and ascorbic oxidase activity in tomato plants infected with Fusarium lycopersici Sacc. Proc. Indian.Acad.Sci., 44B. 5 : 257-270.
- SCHEFFER R.P.- 1960. Variation in respiratory responses in Fusarium-infected tomato plants. Phytopathology, 1 : 259-294.
- SHIROYA M., HATTORI S.- 1955. Studies on the browning and blackening of plants tissues. III - Occurrence in the leaves of Dahlia and several plants of chlorogenic acid as the principal browning agent. Physiol. Plantarum, 8: 358-369.
- SHU-FUNG L. LE TOURNEAU D.- 1958. Chlorogenic acid content and Verticillium wilt resistance of potatoes. Phytopathology, 48 : 268-274.
- SIMONDS A.O., JOHNSON G., SCHAAL L.A.- 1953. Comparative effects of catechol, some related compounds and other chemicals on suberisation of cut potato tubers. Bot. Gaz., 115. 2 : 190-195.

- SISTLER H.D., COX C.E., 1960. Physiology of Fungitoxicity. Dans : Plant Pathology, HORSFALL J.G. et DIMOND A.E.- 1960. Academic Press N.Y. 715 PP : 507-552
- SOLYMOSY F., FARKAS G.L., KIRALY Z.- 1959. Biochemical mechanisms of lesions formation in virus infected plant tissues. Nature, 184 : 706-707.
- TERMOHLEN G.P.- 1962. On corky root of tomato and the corky root fungus. T.PL. Ziekten., 68.6 : 295-367.
- TOMIYAMA .- 1967. Further observations on the tire requirement for hypersensitive cell death of potatoes infected with Phytophthora infestans and its relations to metabolic activity. Phytopathologische Z., 58 : 367-378.
- UMAERUS V.- 1959. The relation ship between peroxidase activity in Potato leaves and resistance to Phytophthora infestans. Amer.Potato J. 36 : 124-131.
- WAGGONER P.E., DIMOND A.E.- 1956. Polyphenol oxidase and substrates in potato and tomato stems. Phytopathology, 46 : 495-497.
- WALKER J.C.-1923. Disease resistance to onion smudge. J. Agric. Res., 24 : 1019-1039.
- WHEELER. H., ROMANKO R.R., KRUPKA L.R.- 1958. Dans : Plant pathology, an advanced treatise HORSFALL J.G., DIMOND A.E.- 1959. Vol. 1. Academic Press. London. 674 PP : 356.
- WHITE P.R.- 1946. Laboratory manual of plant physiology. MACHLIS et TORREY. 1956. ed. FREEMAN et Cie. San Francisco. 282 PP : 59.
- WILLIAMS A.H.- 1963. Enzyme inhibition by phenolic compounds. Dans : Enzyme chemistry of phenolic compounds. PRINDHAM J.B. Pergamon Press 141 PP : 87-95.
- YARWOOD C.E.- 1967. Responses to parasites. Annu.Rev.Plant.Physiol., 18 : 419-438.

NOM DE L'ETUDIANT : BESRI Mohamed

Nature de la thèse: Docteur Ingenieur

Vu, Approuvé

et Permis d'imprimer

NANCY, le 10 Novembre 1970

Le Doyen,

J. AUBRY

FROM THE LIBRARY OF THE

LIBRARY OF THE
UNIVERSITY OF MICHIGAN

UNIVERSITY OF MICHIGAN

LIBRARY OF THE

LIBRARY OF THE

LIBRARY OF THE

LIBRARY OF THE

